

**EVOLUTION DER WEHRCHEMIE VON
BLATTKÄFERLARVEN:
GLUCOSID-ANALOGA ZUR AUFLÄRUNG VON
TRANSPORT-MECHANISMEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
von Dipl. Chem. Birte Kristina Feld
geboren am 3. Mai 1973 in Heidelberg

Gutachter:

1. Prof. E. Anders

2. Prof. W. Boland

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16. Mai 2001

meinen Eltern und
meinen Freunden

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Sequestrierung von Pyrrolizidin-Alkaloiden in Insekten</i>	1
1.2	<i>Wehrchemie in den Chrysomelinae</i>	6
1.2.1	<i>Biosynthese der Wehrsubstanzen</i>	7
	<i>de novo Synthese</i>	10
	<i>Sequestrierung</i>	11
2	AUFGABENSTELLUNG	14
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	16
3.1	<i>Bestimmung der Larvenstadien</i>	16
3.2	<i>Entwicklung der Iridoid- und Glucose-Konzentration im Sekret</i>	17
3.3	<i>Transport verschiedener Phenole und phenolischer Glucoside</i>	19
3.4	<i>Transport von Thioglucosiden</i>	23
3.4.1	<i>Kristallstruktur von Thiosalicin</i>	24
3.4.2	<i>Detektion der Thioglucoside mittels LC-MS</i>	26
1.1.3	<i>Verträglichkeit von Thiosalicin 38 für Larven von <i>P. cochleariae</i></i>	32
1.1.4	<i>Abnahme von Wehrsekret und Hämolymphe</i>	33
1.1.5	<i>Qualitative Übersicht</i>	34
1.1.6	<i>Konkurrenzfütterung von 38 und 39</i>	36
1.1.7	<i>Kinetische Untersuchung des Thioglucosid-Transports</i>	37
	<i>Quantifizierung von Thiosalicin 38</i>	37
	<i>Quantifizierung von 8-Mercaptogeraniol-1'-thio-b-D-glucosid 40</i>	39
	<i>Quantifizierung von 8-Hydroxythiogeraniol-1'-thio-b-D-glucosid 41</i>	41
1.5	<i>Suche nach glucosidisch gebundenen Komponenten in Blättern</i>	43
1.6	<i>In vitro Umsetzung von Plagiodial</i>	44
1.7	<i>Untersuchung auf schwerflüchtige Substanzen im Wehrsekret</i>	47
1.7.1	<i>Silylierungsmittel</i>	47

1.7.2	Untersuchung auf Zucker	48
1.8	Untersuchungen von Polymeren im Wehrsekret	49
1.9	Synthesen	51
1.9.1	Darstellung der phenolischen Glucoside	51
1.9.2	Stabile Analoga der natürlich vorkommenden Glucoside	52
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	57
5	EXPERIMENTELLER TEIL	62
5.1	Allgemeine Vorbemerkungen	62
1.2	Verwendete Chemikalien	63
1.3	Synthesevorschriften	63
1.4	Analytischer Teil	80
1.4.1	LC-MS-Parameter für die Analyse von Thioglucosiden	80
1.4.2	LC-MS-Parameter für die Blattuntersuchungen	82
1.4.3	MALDI-Matrices	82
1.5	Biologischer Teil	83
1.5.1	Zuchtbedingungen	83
1.5.2	Vermessung der Kopfkapselbreite	84
1.5.3	Applikation der Phenole und phenolischen Glucoside	84
1.5.4	Bestimmung der Chrysomelidial- und Glucose-Konzentration	84
1.5.5	Applikation der Thioglucoside	84
1.5.6	Extraktion der Blattinhaltsstoffe	85
1.5.7	Silylierung und Methylierung des Wehrsekrets von <i>P. cochleariae</i>	86
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
7	ANHANG	93
7.1	IR-Spektren	93
7.2	MS-Spektren	97

7.3	<i>¹H-NMR-Spektren</i>	102
7.4	<i>¹³C-NMR-Spektren</i>	107
7.5	<i>Abkürzungen</i>	112
7.6	<i>Veröffentlichungen</i>	113
7.7	<i>Lebenslauf</i>	114
7.8	<i>Danksagungen</i>	115

1 EINLEITUNG

Im Laufe der Evolution unterliegen alle Arten wechselnden äußeren Einflüssen, die sie dazu zwingen, sich immer wieder neu anzupassen. So können beispielsweise Klimaveränderungen dazu führen, dass Pflanzen in bestimmten Regionen aussterben, wodurch herbivore Insektenspezies, die auf und von ihnen leben, sich eine neue Wirtspflanze suchen müssen. Das erfordert zunächst eine Anpassung an deren Sekundärmetabolismus. Außerdem gilt es, sich gegen verschiedenartige Prädatoren zur Wehr zu setzen. Das führt bei den Herbivoren zu der Ausbildung der unterschiedlichsten Abwehrstrategien. Vielfach verwenden die Insekten dafür chemische Substanzen, die sie in speziellen Wehrdrüsen selbst produzieren und dann in Reservoiren speichern, bis sie sie benötigen^[1]. Immer wieder haben sich aber auch Spezialisten entwickelt, die die zur Abwehr von Herbivoren produzierten Sekundärmetaboliten bestimmter Pflanzen aufnehmen und diese ihrerseits zur Abwehr von Fraßfeinden nutzen (sequestrieren).

In Abb. 1 sind einige Beispiele für solche Substanzen aufgeführt. Cardenolide, wie z. B. Strospesid und Digoxin, werden wegen ihrer herzaktiven Wirkung oft als Herzglycoside bezeichnet. Sie werden von Bockkäfern (Cerambycidae^[2]), Blattläusen (Hemiptera^[3]), Graßhüpfern (Pyrgomorphidae^[4]) oder Fleckenfaltern (Nymphalidae^[5]) sequestriert. Iridoid-Glycoside, wie Aucubin oder Catalpol, werden hauptsächlich von verschiedenen Lepidoptera-Arten zur Abwehr von Spinnen und anderen Fraßfeinden genutzt^[6-8]. Außerdem findet man bei diesen z. B. Aristolochiasäure I^[9] oder Allylisothiocyanat^[10].

1.1 Sequestrierung von Pyrrolizidin-Alkaloiden in Insekten

Eine gut untersuchte Substanzklasse stellen die Pyrrolizidin-Alkaloide dar, auf die sich, trotz ihrer hohen Toxizität, viele verschiedene Insekten spezialisiert haben. Sie werden zur Verteidigung genutzt oder sogar in Sexualpheromone umgewandelt^[11]. Man findet sie bei vielen Schmetterlingen und Motten (Lepidoptera^[12,13]), einigen Blattkäfern (Coleoptera^[14,15]) oder dem afrikanischen Grasshüpfer *Zonocerus variegatus* (Orthoptera^[16]).

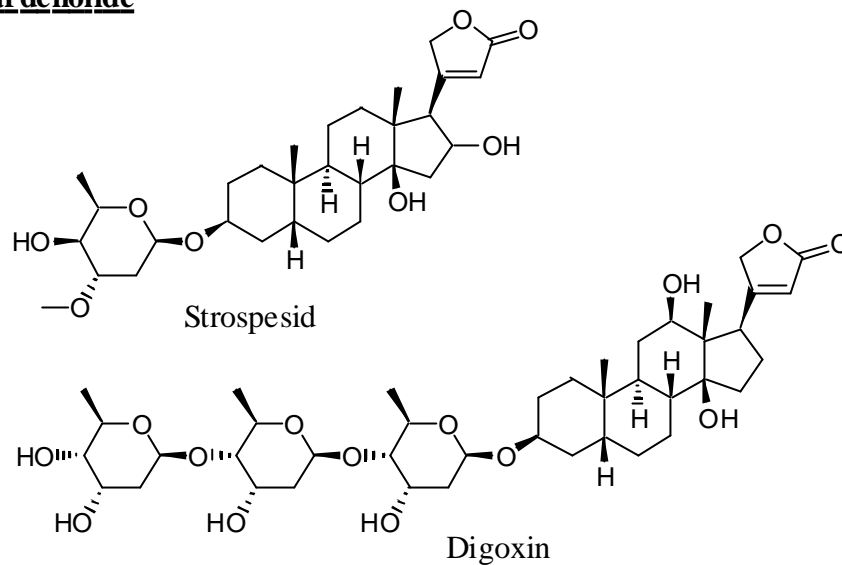
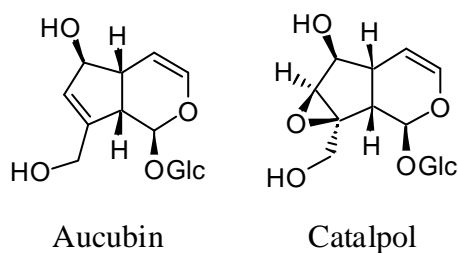
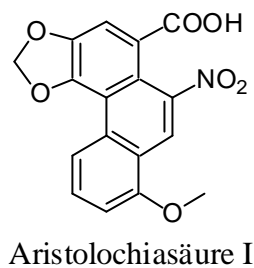
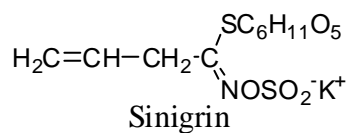
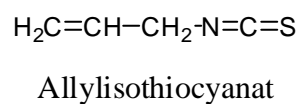
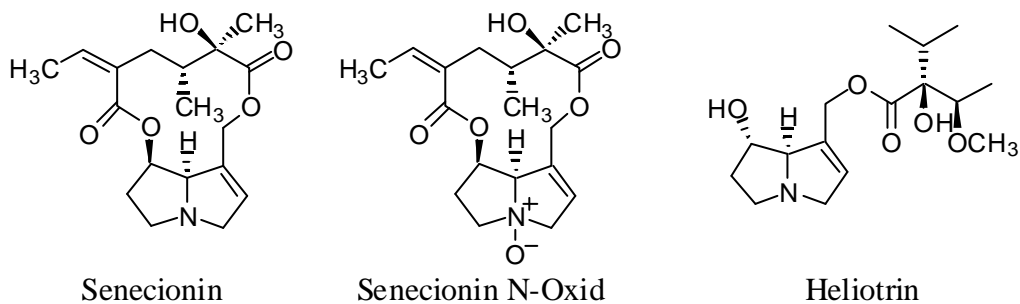
Cardenolide**Iridoide****Aristolochiasäuren****Senföle u.
Senfölglycoside****Pyrrolizidin-Alkaloide**

Abb. 1: Substanzklassen, die von Insekten sequestriert und für die eigene Wehrchemie genutzt werden

Bislang sind etwa 360 Vertreter dieser Substanzklasse bekannt. Es handelt sich dabei um Ester-Alkaloide, bestehend aus einer Necin-Base (Amino-Alkohol) und einer Necin-Säure (meist aliphatische Mono- oder Dicarbonsäure)^[17].

Im Pflanzenreich kommen sie hauptsächlich in den Familien Asteraceae und Fabaceae vor, denen sie wahrscheinlich zur Abwehr von Herbivoren dienen^[18]. Ihre Biosynthese, die in Abb. 2 dargestellt ist, findet hauptsächlich in den Wurzeln statt. Dabei wird die Necin-Base aus Arginin gebildet, während die Necin-Säure aus Isoleucin bzw. Pyruvat entsteht.

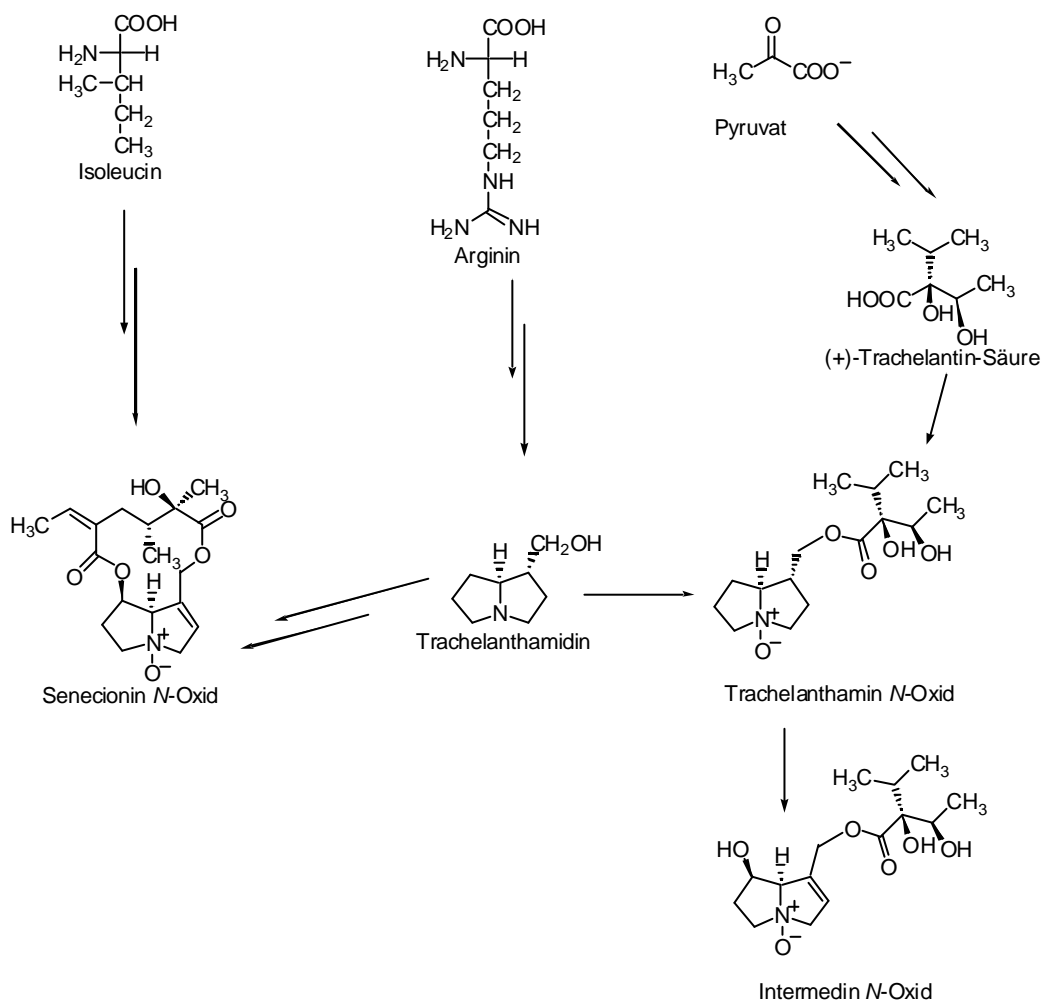


Abb. 2: Biosynthese von Pyrrolizidin-Alkaloid-*N*-Oxiden in Pflanzen^[19]

Lager- und Transportform sind die polaren *N*-Oxide. Über das Phloem gelangen sie in die übrigen Pflanzenteile^[20].

Die *N*-Oxide selbst sind nicht giftig, können aber bereits durch sehr schwache Reduktionsmittel wie die Aminosäure Cystein zu den Pyrrolizidin-Alkaloiden umgesetzt werden.

Die toxische Wirkung der Pyrrolizidin-Alkaloide basiert auf einer Bioaktivierung im Organismus. Sie können von P450-Enzymen in instabile Pyrrol-Intermediate überführt werden, die eine stark alkylierende Wirkung zeigen. Wichtig für diesen Abbau sind dabei drei Strukturmerkmale (Abb. 3)^[21,22]:

- 1.) 1,2-Doppelbindung
- 2.) Allylestergruppe an C-9
- 3.) freie oder veresterte Hydroxygruppe an C-7

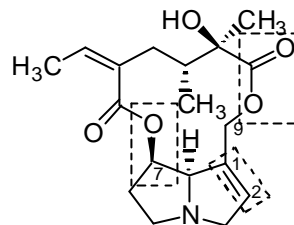


Abb. 3: Strukturmerkmale, die die Toxizität von Pyrrolizidin-Alkaloiden ausmachen

In den Insekten haben sich verschiedene Strategien zum Umgang mit diesen giftigen Pyrrolizidin-Alkaloiden (PAs) entwickelt. Abb. 4 zeigt das am Beispiel von zwei Chrysomeliden und zwei Lepidoptera-Arten.

Der Blattkäfer *Chrysolina coerulans* lebt in der Natur auf Minze (*Mentha spicata*), wo er niemals in Kontakt mit PAs kommt. In seinem Darm werden Pyrrolizidin-Alkaloid-*N*-Oxide (PA-Os) fast vollständig reduziert. Die entstehenden lipophilen PAs können dann passiv in die Hämolymphe gelangen, von wo sie in den Darm zurücktransportiert und mit den Feces ausgeschieden werden. In der Hämolymphe findet keinerlei Oxidation zu PA-Os statt. Es fällt aber auf, dass ein kleiner Teil der über den Fraß aufgenommenen PA-Os auch in die Hämolymphe gelangt. Da die *N*-Oxide zu polar sind, um die Membranen passieren zu können, ist es wahrscheinlich, dass sie mit Hilfe eines unspezifischen Transporters durchgeschleust werden.

In dem nahverwandten Blattkäfer *Oreina cacaliae* dagegen ist die Reduktion der *N*-Oxide im Darm fast vollständig unterdrückt. Sie gelangen vielmehr in die Hämolymphe, wozu ein ausgeprägtes Transportsystem existieren muss. PAs selbst werden dagegen entweder ausgeschieden oder, wenn sie durch Diffusion in die Hämolymphe gelangen, glycosidiert, was wahrscheinlich der Entgiftung dient.

Die Tatsache, dass sogar *C. coerulans* in geringem Maße in der Lage ist, PA-Os aus dem Darm in die Hämolymphe zu transportieren, könnte eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung der Sequestrierer gewesen sein. Auf der

Basis eines bereits bestehenden unspezifischen Transportsystems war eine Spezialisierung auf den Sekundärmetabolismus der Fraßpflanze möglich.

In den Lepidoptera Spezies stellt sich ein etwas anderes Bild dar. Sowohl in *Spodoptera littoralis* als auch *Tyria jacobaeae* werden PA-Os vollständig im Darm reduziert. Die entstehenden PAs gelangen dann durch Diffusion in die Hämolymphe. *Sp. littoralis*, die zwar auf PA-haltigen Pflanzen leben, aber keine Sequestrierer sind, verfügen über ein gutes System um diese wieder auszuschcheiden.

In *T. jacobaeae* dagegen findet fast keine Ausscheidung von PAs über den Darm statt. Nach der Diffusion in die Hämolymphe werden sie zu PA-Os oxidiert und dort gespeichert.

Vergleicht man nun die beiden sequestrierenden Spezies *O. cacaliae* und *T. jacobaeae*, findet man einige Gemeinsamkeiten, obwohl sie zu völlig unterschiedlichen Insektenfamilien gehören. Beide verhindern die Akkumulation der giftigen Pyrrolizidin-Alkaloide und speichern sie in Form ihrer *N*-Oxide. Außerdem ist bei beiden Spezies die Fähigkeit zur Ausscheidung von PA-Os stark unterdrückt.

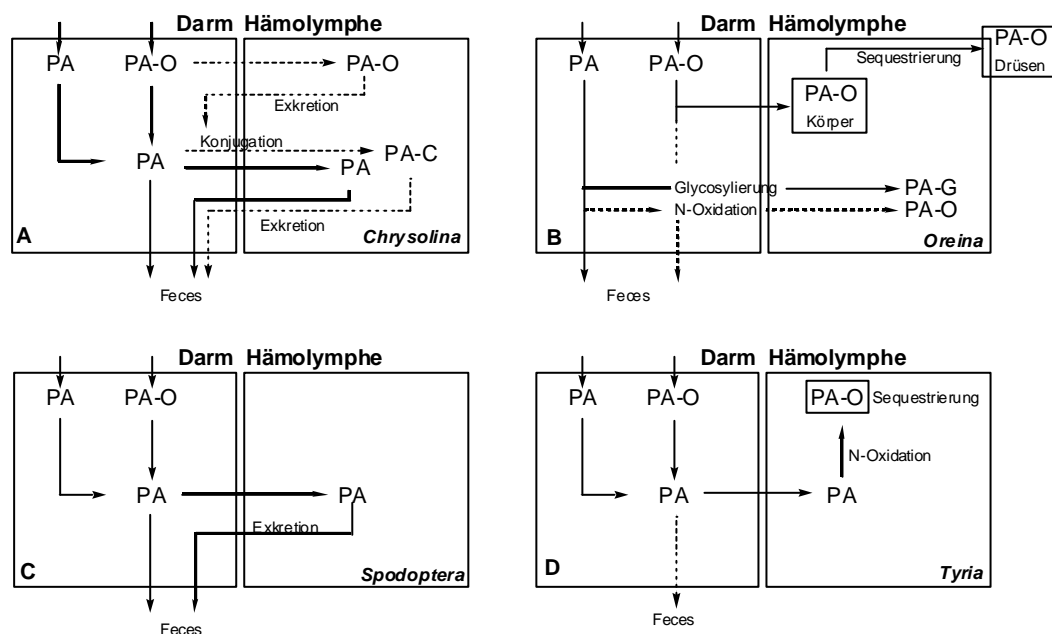


Abb. 4: Strategien zur Aufnahme, Metabolisierung und Speicherung von tertiären Pyrrolizidin-Alkaloiden (PA) und ihren *N*-Oxiden (PA-O) in (A) *Chrysolina coerulea* (unangepasst, keine Sequestrierung, biochemische Kontrolle); (B) *Oreina cacaliae* (angepasst, Sequestrierer); (C) *Spodoptera littoralis* (Tolerierung von Alkaloiden, keine Sequestrierung); (D) *Tyria jacobaeae* (angepasst, Sequestrierer). Pfeile: Hauptweg; gestrichelte Pfeile: untergeordneter Weg. PA-C = Pyrrolizidin-Alkaloid-Konjugat; PA-G = Pyrrolizidin-Alkaloid-Glucosid^[23]

Die Sequestrierung von Pflanzeninhaltsstoffen hat sich bei verschiedenen Insektenfamilien mehrfach und unabhängig voneinander entwickelt. Sie bietet im Vergleich zur *de novo* Produktion Vor- und Nachteile, die in Tabelle 1^[24] aufgeführt sind.

	Energiebilanz	Flexibilität
<i>de novo</i>	hoher Energieaufwand ⇒ viele Syntheseschritte	groß ⇒ völlige Unabhängigkeit der Wehrchemie von Fraßpflanze
Sequestrierung	niedriger Energieaufwand ⇒ keine oder nur wenige Syntheseschritte ^[25]	keine ⇒ bei Wechsel auf Fraßpflanze ohne Vorstufe folgt völliger Verlust der Verteidigung ^[26]

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der *de novo* Produktion und Sequestrierung von Wehrsubstanzen

Der Fall der Blattkäfer *C. coerulans* und *O. cacaliae* zeigt, dass bereits das Vorhandensein eines unspezifischen Transportsystems im Archetypus, zu einer Spezialisierung auf die Sequestrierung führen kann, wenn sich ein evolutiver Vorteil daraus ergibt.

Ein weiteres Beispiel für die Evolution von Sequestrierern aus *de novo* Produzenten findet man in der Blattkäferunterfamilie Chrysomelinae. Bereits im Archetypus existieren Mechanismen, die eine Weiterentwicklung der Wehrchemie ermöglichen. Das soll im folgenden näher erläutert werden.

1.2 Wehrchemie in den Chrysomelinae

Chrysomelinae gehören zu den Chrysomelidae, die mit 37000 beschriebenen und vermutlich weiteren 20000 unbeschriebenen Arten eine der größten Familien der Käfer überhaupt darstellt^[27]. Erste fossile Funde gehen auf das späte Paläozoikum und das frühe Mesozoikum^[28] zurück. Außerdem sind sie in der ganzen Welt verbreitet. Um so erfolgreich sein zu können, waren sie darauf angewiesen, im

Laufe ihrer Evolution ausgefeilte Mechanismen zu ihrer Verteidigung zu entwickeln, da besonders ihre Larven die meiste Zeit ihres Daseins exponiert auf der Blattoberfläche ihrer Wirtspflanze verbringen, um zu fressen. Dadurch sind sie sehr leicht angreifbar durch Prädatoren wie beispielsweise Ameisen, Spinnen oder Vögel^[27]. So haben einige Larven Haare und Sklerite ausgebildet, während andere auf chemische Abwehr zurückgreifen, wie im Falle der Subtriben Chrysomelina und Phyllodectina, die zur Unterfamilie der Chrysomelinae gehören^[29]. Ihre Wehrsysteme wurden erstmalig 1915 von Garb im Detail beschrieben^[30].

Diese Blattkäferlarven haben neun paarige Tubuli auf ihrem Meso- und Metathorax, sowie auf den ersten sieben Abdominalsegmenten. Abb. 5 zeigt die auf ihrer Innenseite sitzenden blasenförmigen Reservoirs, in denen sich das Wehrsekret befindet. Sie sind jeweils mit Drüsenzellen besetzt, deren Anzahl je nach Spezies variiert. Der Transport von Komponenten aus den Drüsen in die Reservoirs erfolgt durch einen schmalen Kanal, einem sogenannten Duktus, der beide verbindet und einen Substanzfluss in die entgegengesetzte Richtung nicht zulässt. Ein direkter Transfer von Vorstufen aus der Hämolymphe in die Reservoirs ist auch vorstellbar. Allerdings ist in diesem Fall ein Transportsystem durch die Membranen nötig.

Die Reservoirs können bei Gefahr durch Erhöhung des Hämolympdruckes nach außen gestülpt werden, wodurch das klebrige Wehrsekret freigesetzt wird. Wenn die Gefahr vorüber ist, können sie wieder mit Hilfe von Muskelsträngen eingezogen werden, um das unverbrauchte Sekret für einen späteren Zeitpunkt aufzusparen.

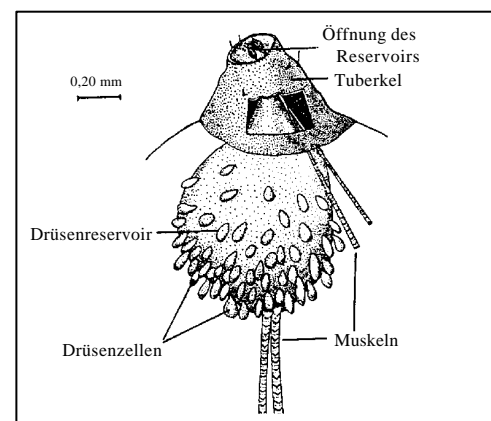


Abb. 5: Detailzeichnung einer exokrinen Larvaldrüse von *Chrysomela tremulae* (nach Hinton)^[31]

1.2.1 Biosynthese der Wehrsubstanzen

Bei den Wehrsubstanzen der Chrysomelinae-Larven handelt es sich in den meisten Fällen um alicyclische Aldehyde, die mit den Proteinen der Antennen von Ameisen reagieren können, wodurch sie Angreifer "erblinden" lassen^[32].

Außerdem zeigt z. B. Chrysomelidial **1** antibakterielle und antifungale Aktivität^[33].

Grundsätzlich lassen sich die bislang gefundenen Wehrsubstanzen in zwei verschiedene Gruppen einteilen: *de novo* produzierte Iridoide (cyclopentanoide Terpene, Abb. 6), und aus den Fraßpflanzen sequestrierte, häufig aromatische Verbindungen (Abb. 7)^[34].

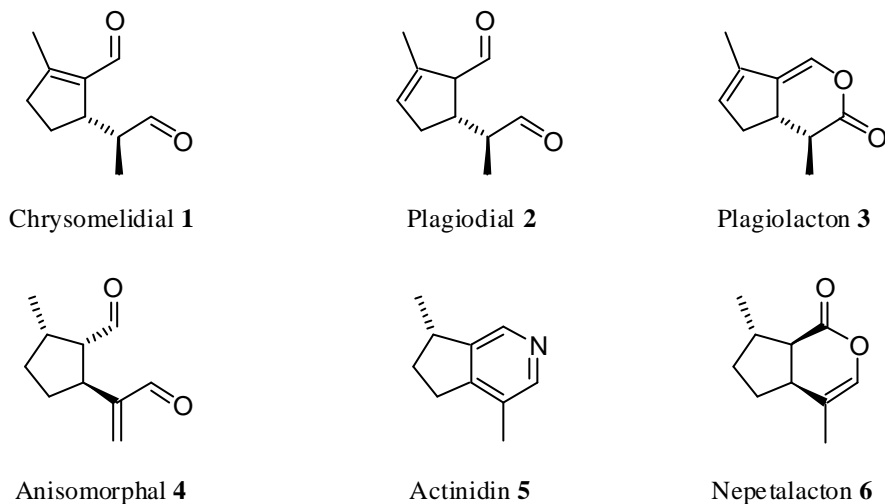


Abb. 6: Iridoide aus dem Wehrsekret von Chrysomelinae Larven

In Larven der Spezies *Phaedon cochleariae* und *Gastrophysa viridula* findet man als Hauptkomponente des Wehrsekrets Chrysomelidial **1**. Die Hauptkomponente in *Plagiodera versicolora* ist Plagiodial **2**.

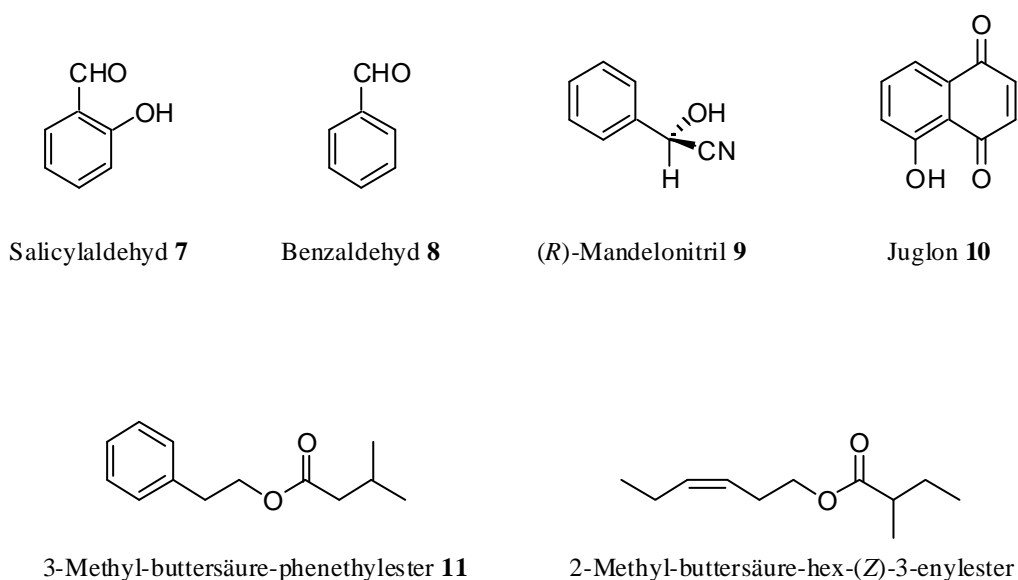


Abb. 7: Aromatische Komponenten aus dem Wehrsekret von Chrysomelinae Larven

Salicylaldehyd **7** findet man dagegen in Larven der Spezies *Phratora vitellinae*

oder *Chrysomela populi*, die auf *Salix* bzw. *Populus* fressen. In den Blättern dieser Bäume ist das Glucosid Salicin **20** enthalten^[35,36], das von den Larven sequestriert wird. Die Buttersäureester **11** und **12** werden von Larven verschiedener *Chrysomela* Spezies gebildet und stellen eine biosynthetische Mischung dar. Es handelt sich dabei um einen aus dem Blatt sequestrierten Alkohol, der mit einer *de novo* produzierten Buttersäure verestert wird^[37].

Abb. 8 zeigt einen Stammbaum, der von Termonia *et al.* anhand von Nucleotidsequenzen von 12S und 16S mt ribosomaler RNA erstellt wurde. Man sieht, dass sich verschiedenfach die Sequestrierung von Salicin **20**, das dann zu Salicylaldehyd **7** umgesetzt wird, aus der *de novo* Produktion von Iridoiden entwickelt hat. An diesem Punkt ist die Evolution aber nicht stehengeblieben. Vielmehr haben sich aus diesen hochspezialisierten Spezies einige *Chrysomela* Spezies entwickelt, die andere Blattalkohole sequestrieren, die im Gegensatz zum Salicin **20** sehr häufig vorkommen. Diese werden dann mit *de novo* produzierten Butyraten verestert. Dadurch werden die Käfer flexibler, wenn sie zur Anpassung an andere Wirtspflanzen gezwungen sind.

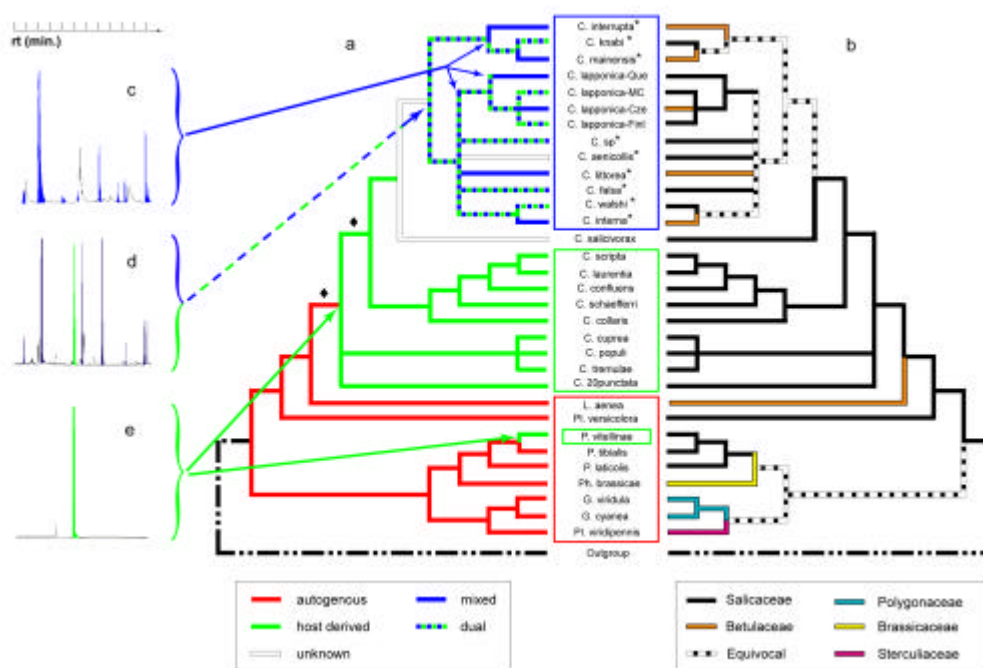


Abb. 8: Evolution von chemischen Verteidigungsstrategien und Wirtspflanzenassoziationen in Chrysomelinae Larven. (a) Entwicklung der Wehrchemie (rot = *de novo* produzierte Iridoide; grün = Salicylaldehyd (e) durch Sequestrierung; blau = Mischung aus Buttersäuren und Buttersäureestern mit sequestrierten Blattalkoholen (c); (d) zeigt ein gemischtes Chromatogramm aus allen sequestrierten Substanzen); (b) Rekonstruktion der Wirtspflanzenwahl (*=nordamerikanische Spezies, Que = Queyras (F); Cze = Tschechien; Finl = Finnland)^[38]

Da diese Weiterentwicklungen mehrfach und unabhängig voneinander auftreten, liegt es nahe, dass bereits in den *de novo* Produzenten Mechanismen vorhanden sein müssen, die das Sequestrieren von Salicin **20** ermöglichen.

Um einen solchen Mechanismus zu entdecken, ist es nötig, die Biosynthese der Iridoide und von Salicylaldehyd einander gegenüberzustellen und auf Gemeinsamkeiten zu überprüfen.

de novo Synthese

Iridoide werden von den Larven, z. B. *Phaedon cochleariae* oder *Gastrophysa viridula*, *de novo* produziert.

Abb. 9 zeigt, dass es sich dabei um eine klassische Terpenbiosynthese handelt. Ausgehend von Mevalonsäure **16** wird in den Drüsenzellen Geraniol gebildet, anschließend zum 8-Hydroxygeraniol **14** hydroxyliert und in 8-Position glucosidiert. Der Grund für die Glucosidierung von **14** ist wohl darin zu sehen, dass nur die hydrophilen Glucoside durch den Duktus in die Reservoirs transportiert werden können. Dort wird die Glucose wieder abgespalten und der Dialkohol **14** zum Dialdehyd **15** oxidiert^[39-41].

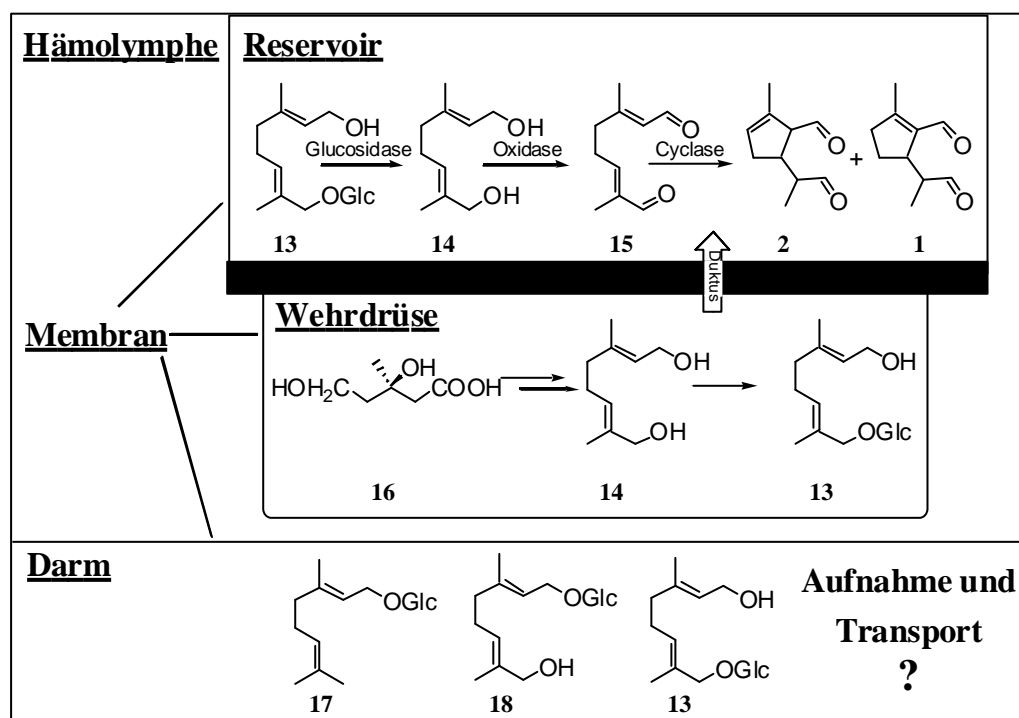


Abb. 9: Schematische Darstellung der *de novo* Synthese von Chrysomelidial **1** und Plagiodial **2**

Abb. 10 zeigt einen möglichen Mechanismus der Cyclisierung. Er basiert auf der

Beobachtung, dass 8-Oxogeranial **15** in der Gegenwart von Aminen in guten Ausbeuten cyclisieren kann^[42,43].

Dabei bildet **15** mit einer enzymatischen Amino-Funktion ein Imin, das dann nach einer basenkatalysierten Abspaltung von H_S an C-5 zu einem Dienamin umlagert. Dieses kann in einer konzertierten [4π+2π]-Cycloaddition zu einem intermediären 2-Aminodihydropyran reagieren. Die Reaktion ist *endo*-gesteuert und führt deshalb zu einer *syn*-Verknüpfung. Um welches Enantiomer - 4a*R*,7a*R* (s. Abb. 10) oder 4a*S*,7a*S* - es sich handelt, wurde bislang nicht geklärt. Nach einer abschließenden Hydrolyse entsteht je nach Spezies entweder Plagiodial **2** oder Chrysomelidial **1**.

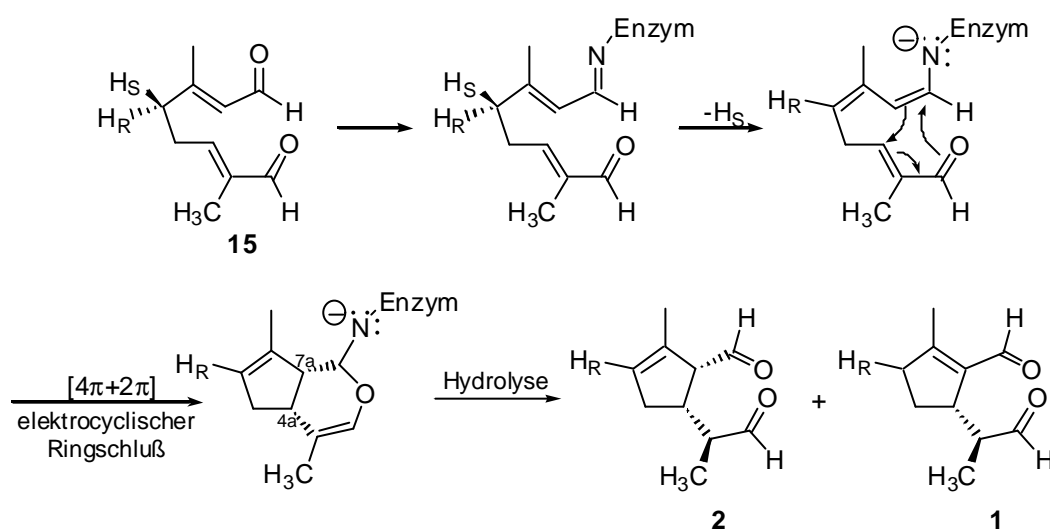


Abb. 10: Vermutlicher Mechanismus bei der Cyclisierung von 8-Oxogeranial **15** in Blattkäferlarven^[44]

Die lipophilen Produkte setzen sich von dem hydrophilen Teil des Wehrsekrets ab und bilden deutlich sichtbare Tröpfchen. Dadurch findet innerhalb des Wehrsekrets eine „Unterteilung“ statt, durch die verhindert wird, dass die lipophilen Bestandteile wieder aus dem Reservoir herausdiffundieren können.

Verschiedene Versuche mit markierten, biosynthetischen Vorstufen haben bereits gezeigt, dass die *de novo* Produzenten auch in der Lage sind, Substanzen aus der Nahrung zu sequestrieren^[45].

Sequestrierung

Abb. 11 zeigt schematisch die Biosynthese von Salicylaldehyd **7** aus Salicin **20**, wie sie bei den Larven der Gattungen *Phratora vitellinae* und *Chrysomela populi* gefunden wird. In welcher Form das Saligenin **21** transportiert wird, ob als

Glucosid oder als Aglycon, ist bisher noch nicht im Detail untersucht worden. Im Sekret von *P. vitellinae* wird eine β -Glucosidase gefunden, deren Aktivität viermal größer ist als bei einer im Darm vorhandenen Glucosidase. Pasteels *et al.* schließen daraus, dass das Glucosid intakt in das Wehrsekret transportiert wird. Nach der Abspaltung der Glucose erfolgt eine Oxidation von **21** zu **7**^[46].

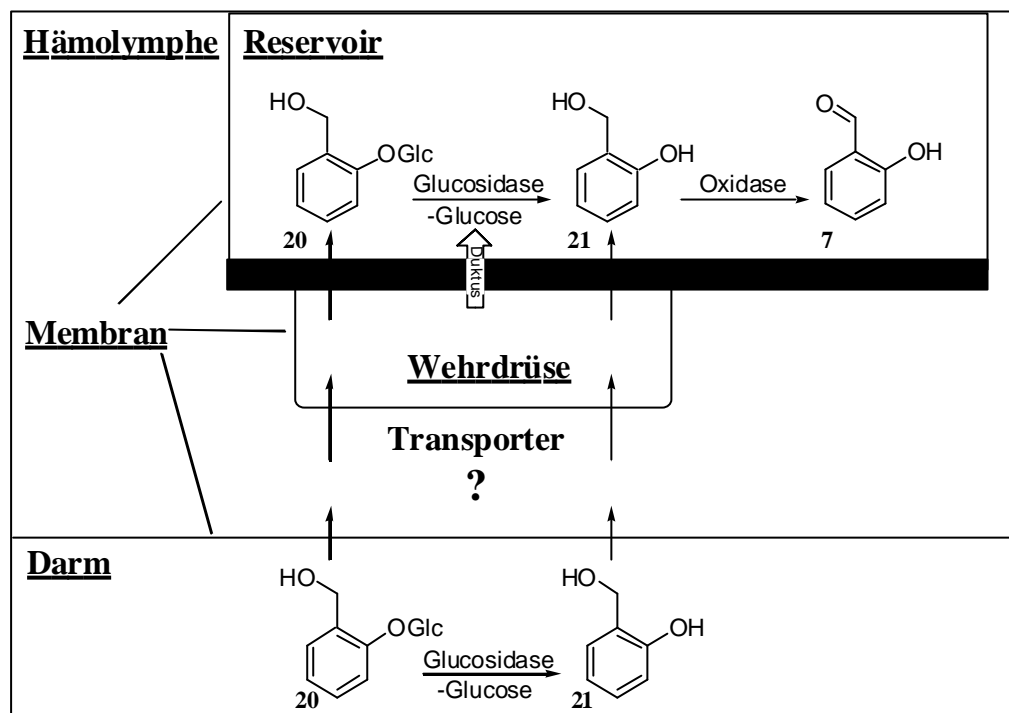


Abb. 11: Schematische Darstellung der Sequestrierung von Salicin **20** zu Salicylaldehyd **7**^[47]

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die im Sekret vorhandenen Oxidasen der *de novo* Produzenten und der Sequestrierer jeweils in der Lage sind, sowohl 8-Hydroxygeraniol als auch Saligenin zu oxidieren^[48].

Außerdem zeigen Versuche mit der Glucosidase des *de novo* Produzenten *Plagioderia versicolora*, dass sie sehr unspezifisch ist und eine Reihe von phenolischen und terpenoiden Glucosiden spalten kann^[47].

Der Vergleich verdeutlicht also, dass bereits in dem Sekret der *de novo* Produzenten eine Glucosidase und eine Oxidase vorhanden sind, die Salicin **20** umsetzen können. Es gibt also zwei wesentliche Grundvoraussetzungen für eine Entwicklung von Sequestrierern aus einem gemeinsamen Archetypus^[49].

In der Folge ist es nun interessant, genauer zu untersuchen, wie der Transport der Blattinhaltsstoffe in die Wehrdrüsen und Reservoirs abläuft. Wie oben bereits

erwähnt, werden bei den Sequestrierern wahrscheinlich intakte Glucoside transportiert. Es muss also im Darm und an allen anderen Membranen, die passiert werden müssen, ein aktives Transportsystem existieren, da Glucoside zu polar sind, um die Membranen passiv passieren zu können. Der Nachweis der Existenz eines solchen Systems bereits in den *de novo* Produzenten würde dann den letzten fehlenden Baustein liefern, um zu verstehen, wie es zu der Ausbildung einer hoch-spezialisierten Wehrchemie kommen konnte.

Erste Schritte zur Klärung dieser Fragestellung wurden bereits an *Phaedon cochleariae* Larven durchgeführt.

Über Fütterungsversuche mit Phenolen und phenolischen Glucosiden (Abb. 12) konnte gezeigt werden, dass es offensichtlich bei dem Transport dieser Substanzen eine Bevorzugung für die *o*-Substitution gibt. *m*-Substituierte Phenole werden weder als Aglycon noch als Glucosid transportiert^[50].

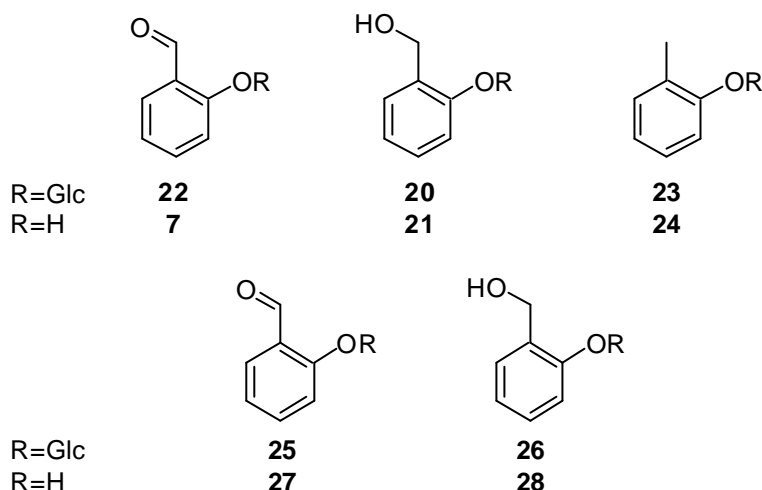


Abb. 12: Phenole und phenolische Glucoside, die für Transportversuche an *P. cochleariae* Larven verwendet wurden

Weitere Untersuchungen, durch die die Existenz eines Transporters für glucosidisch gebundene Vorstufen der Wehrsubstanzen in Chrysomelinae-Larven gezeigt werden könnte, stehen noch aus.

2 AUFGABENSTELLUNG

In der Subfamilie Chrysomelinae haben sich mehrfach und unabhängig voneinander aus den *de novo* produzierenden Larven Sequestrierer entwickelt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Verteidigung mit Hilfe von Salicylaldehyd erst entstanden ist, nachdem ein Wechsel auf Wirtspflanzen mit einem hohen Salicingehalt stattgefunden hat^[51]. Experimente an *P. versicolora* und *G. viridula* geben Hinweise darauf, dass das möglich sein sollte, da bereits in den archetypischen *de novo* Produzenten die prinzipiell erforderlichen enzymatischen Aktivitäten, nämlich eine β -Glucosidase und eine Oxidase, vorhanden sind, die auch in der Lage sind, Salicin umzusetzen^[52,39].

Bislang ist nicht geklärt, ob das sequestrierte Glucosid im Darm gespalten wird oder intakt in das Wehrsekret gelangt. Das Vorhandensein einer starken β -Glucosidaseaktivität im Wehrsekret gibt allerdings Grund zu der Annahme, dass ein aktiver Transporter für Glucoside existieren könnte^[46]. Sollte sich herausstellen, dass nicht nur die Sequestrierer, sondern auch die *de novo* Produzenten über ein solches System verfügen, wäre ein dritter enzymatischer Mechanismus gefunden, der die Entwicklung von Sequestrierern aus *de novo* Produzenten plausibel macht.

Hauptziel der Promotionsarbeit war deshalb die Untersuchung von Transportvorgängen aus dem Darm in die Wehrdrüsen.

Fütterungsversuche mit verschiedenen phenolischen Substraten sollten weiteren Aufschluss über die Selektivität des Transports von Phenolen und phenolischen Glucosiden in *P. cochleariae* und *G. viridula* geben.

Des weiteren sollten stabile Analoga der Glucoside von Saligenin **21**, Geraniol und 8-Hydroxygeraniol **14** synthetisiert werden, die nicht durch in den Larven vorkommende Glucosidasen gespalten werden können.

Um auch geringe Konzentrationen in Wehrsekret und Blattkäferlarven nachweisen zu können, musste zunächst eine geeignete Analysenmethode etabliert werden.

Fütterungsversuche an verschiedenen Blattkäferlarvenspezies sollten Aufschluss über die Transportfähigkeiten und Selektivitäten geben. Dabei lag der Schwerpunkt besonders auf zwei Fragestellungen:

- Sind die verschiedenen Larven grundsätzlich in der Lage, eine Vielfalt unterschiedlicher Glucoside in ihr Wehrsekret zu transportieren?
- Besitzen Sequestrierer ein effektiveres Transportsystem für Glucoside als *de novo* Produzenten?

In diesem Zusammenhang sollte auch der weitere Verbleib der Glucose im Wehrsekret untersucht werden, indem die Entwicklung der Iridoid- und Glucosekonzentration in *P. cochleariae* bestimmt wurde.

Ein weiteres Ziel war es, noch unbekannte Inhaltsstoffe des Wehrsekrets zu identifizieren.

Die Isomerisierung von Plagiodial **2** zu Chrysomelidial **1** im Wehrsekret von *P. cochleariae* sollte auf ihre Stereoselektivität hin untersucht werden, um mechanistische Vergleiche mit karnivoren Staphyliniden durchführen zu können, die ebenfalls Iridoide produzieren.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Bestimmung der Larvenstadien

Zu der Entwicklung von Blattkäferlarven und der Anzahl ihrer Häutungen sind bereits vielfältige Studien durchgeführt worden. *P. cochleariae* durchlaufen beispielsweise drei Larvenstadien, bevor sie sich verpuppen. Der genaue Zeitraum, den die einzelnen Larven zu ihrer Entwicklung brauchen, hängt allerdings stark von äußeren Faktoren, wie Temperatur und Futterangebot, ab.

Um unter definierten Bedingungen zu arbeiten, sollten nur Larven verwendet werden, die bereits das dritte Larvenstadium erreicht hatten. Deshalb wurde untersucht, nach wie vielen Tagen die Larven unter unseren Zuchtbedingungen dieses Stadium erreichen.

Der sklerotisierte Teil einer Larve ist starr und verändert seine Größe erst durch eine Häutung. Deshalb lässt er sich zur Bestimmung der einzelnen Larvenstadien benutzen^[53]. Die Kopfkapselbreite von 275 Larven wurde mit Hilfe eines Messokulars unter dem Stereomikroskop ausgemessen. Aus der Häufung um bestimmte Werte wurden die Larvenstadien bestimmt (Abb. 13).

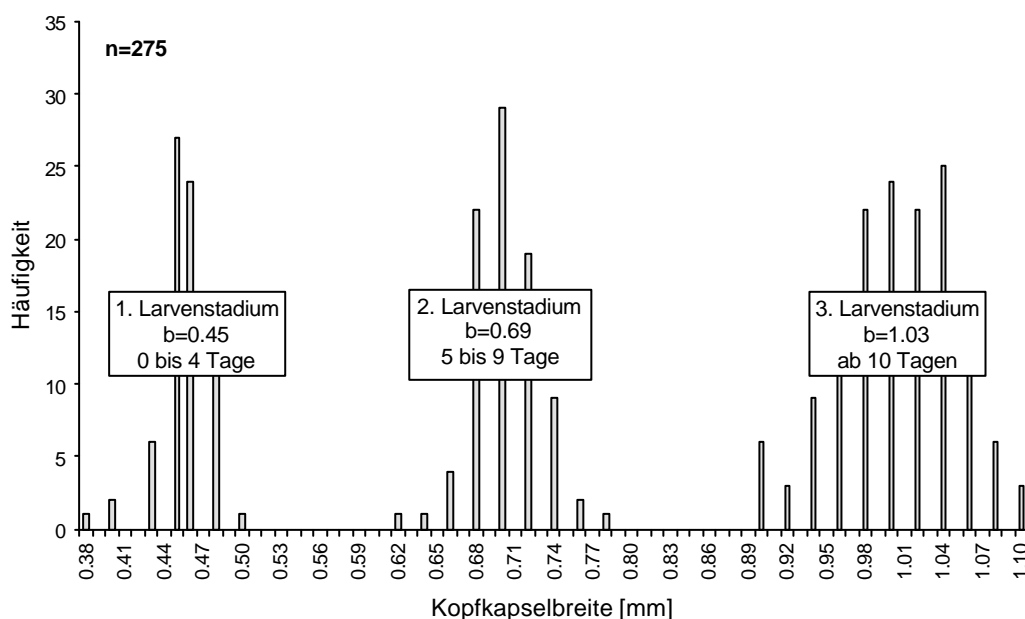


Abb. 13: Larvenstadien von *Phaeton cochleariae* (b = durchschnittliche Kopfkapselbreite)

Anhand der so ermittelten Korrelation zwischen Kopfkapselbreite und

Larvenstadium konnte nun wiederum bestimmt werden, dass sich alle Larven, die zehn Tage und älter sind, im dritten Larvenstadium befinden.

3.2 *Entwicklung der Iridoid- und Glucose-Konzentration im Sekret*

Die Bildung und Speicherung von Wehrsubstanzen birgt für Insekten immer die Gefahr, dass sie sich selbst damit vergiften. Um das zu verhindern, haben sie verschiedene Strategien entwickelt. *Oreina cacaliae* speichert beispielsweise die sequestrierten Pyrrolizidin-Alkaloide in Form ihrer ungiftigen *N*-Oxide in der Hämolymphe. Dort können sie nicht wieder zu den toxischen Aminen reduziert werden. Nachdem ein Angreifer die Oxide aufgenommen hat, werden sie in seinem Darm gespalten und können von P450-Enzymen in giftige Metabolite umgesetzt werden^[23].

Andere Insekten, wie *P. cochleariae*, speichern dagegen ihre Wehrsubstanzen in Reservoiren. Dabei handelt es sich in der Regel um Einstülpungen der Epidermis, die mit Kutikula überzogen sind. Dadurch befindet sich das Sekret sozusagen außerhalb des Körpers. Durch einen Duktus können Substanzen aus dem Insekt in das Sekret transportiert werden. Einen Transport in die umgekehrte Richtung gibt es allerdings nicht^[54].

In den *de novo* Produzenten findet der erste Teil der Iridoid-Biosynthese in den Drüsen statt. Für den Transport durch den Duktus wird das hydrophile Glucosid **13** gebildet. Im Reservoir wird es dann wieder gespalten und weiter umgesetzt^[39]. Was weiterhin mit der Glucose passiert, ist bislang nicht geklärt. Es ist anzunehmen, dass sie im Sekret angereichert wird und dort für den Energiehaushalt der Larve verloren ist. Aus diesem Grund wurde die Entwicklung des Gehalts an Chrysomelidial **1** und Glucose im Sekret untersucht.

Zur Quantifizierung dieser beiden Substanzen wurde das Sekret von *P. cochleariae* Larven mit Hilfe eines Filterpapiers von ihrem Rücken abgestreift, gewogen und dann mit einem Zweiphasengemisch aus Wasser und Tetrachlorkohlenstoff extrahiert. Die organische Phase enthielt gleichzeitig Citronellal **29** als internen Standard. So konnte der Gehalt an Chrysomelidial **1** bequem per GC-MS bestimmt werden. Die Glucosekonzentration wurde aus der wässrigen Phase mit Hilfe eines

Enzymassays bestimmt.

Das daraus resultierende Ergebnis zeigt Abb. 14. Der Gehalt von Chrysomelidial **1** im Wehrsekret nimmt im Lauf der Zeit langsam zu, bis die Larven ein Alter von 16 Tagen erreicht haben. Dann kommt es wieder zu einer Abnahme des Chrysomelidialgehalts. Wahrscheinlich produzieren die Larven zu diesem Zeitpunkt bereits kein neues Sekret mehr, da sie im Alter von 17 Tagen damit beginnen, sich zu verpuppen. Die Abnahme ist dadurch zu erklären, dass die Larven das Sekret auch dazu einsetzen, sich gegenseitig auf Distanz zu halten, so dass es immer wieder zum Ausstülpen der Wehrdrüsen und damit zum Verlust des Chrysomelidials **1** kommt.

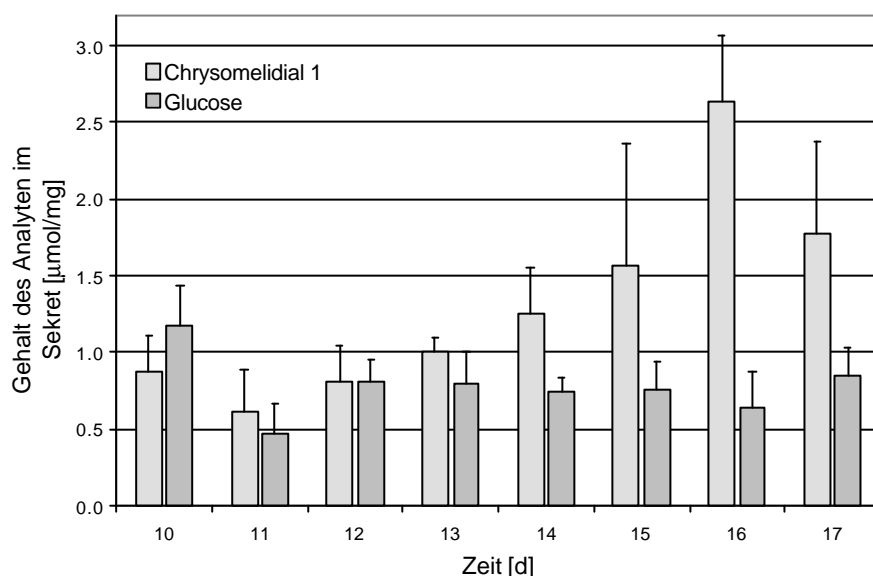


Abb. 14: Akkumulation von Chrysomelidial **1** und Glucose im Wehrsekret von *P. cochleariae* Larven

Dagegen bleibt der Gehalt an Glucose fast konstant auf dem gleichen, niedrigen Level unterhalb von 1 $\mu\text{mol/mg}$. Sie muss also im Sekret abgebaut oder umgesetzt werden. Beispielsweise wäre eine Kupplung zu Oligosacchariden möglich.

Rowell-Rahier und Pasteels haben gezeigt, dass eine vermehrte Abgabe und eine dadurch bedingte, erhöhte Nachproduktion des Sekrets, bei den Sequestrierern *P. vitellinae* zu einer Erhöhung des Gewichtes und damit der Fitness bei den Adulten führt. Sie schließen daraus, dass die Larven nach der Spaltung des Salicins **20** die Glucose zurückgewinnen und als zusätzliche Energiequelle nutzen können, die ihnen sonst nicht zur Verfügung stünde^[24].

Da davon auszugehen ist, dass der prinzipielle Mechanismus der Sekretproduktion in *de novo* Produzenten und Sequestrierern ähnlich aufgebaut ist, könnte man auch schließen, dass *P. cochleariae* ebenfalls in der Lage ist, die Glucose zurückzugewinnen.

Dies würde allerdings bedeuten, dass ein Transporter für Glucose aus den Reservoiren heraus existieren muss, was im Widerspruch zu dem oben beschriebenen Prinzip steht, dass die Reservoire ein abgeschlossenes System darstellen. Trotzdem sollte diese Möglichkeit bei der Interpretation der Kurven aus Abb. 14 nicht völlig außer Acht gelassen werden.

3.3 *Transport verschiedener Phenole und phenolischer Glucoside*

Bei den *de novo* Produzenten *P. cochleariae* und *G. viridula* wurden Hinweise darauf gefunden, dass sie in der Lage sind, Vorstufen ihrer Wehrsubstanzen zu sequestrieren^[45]. Appliziert man ihnen über den Fraß Salicin **20** oder Saligenin **21**, findet man in ihrem Wehrsekret sogar Salicylaldehyd **7**. Darum sollte in Fütterungsexperimenten untersucht werden, ob phenolische Glucoside mit unterschiedlichen Substitutionsmustern in die Reservoire transportiert werden können. Gleichzeitig sollten auch die entsprechenden Aglycone verfüttert werden. Diese sind so unpolar, dass sie prinzipiell bereits durch Diffusion in die Reservoire gelangen können. Deshalb wurde erwartet, dass sich für die Glucoside, im Gegensatz zu den Aglyconen, eine gewisse Selektivität bezüglich des Substitutionsmusters zeigen sollte.

Erste Experimente, bei denen *P. cochleariae* Larven mit Blättern gefüttert wurden, die mit *o*- bzw. *m*-substituierten Phenolen oder Phenolglucosiden imprägniert worden waren, wurden bereits unternommen^[50]. Sie sollten im Rahmen dieser Arbeit für weitere *m*- und *p*-substituierte Phenole vervollständigt werden.

Dazu wurden zuerst die benötigten Glucoside **30**, **32**, **33** und **34** synthetisiert und anschließend an die Larven verfüttert. Nach drei Tagen wurde das Wehrsekret mit einer Kerbspritze abgenommen und per GC-MS analysiert, wobei allerdings nur das Vorhandensein der freien Aglycone detektiert werden konnte, da Glucoside unterivatisiert nicht GC-gängig sind. Um zu bestimmen, ob die gefütterten

Substanzen sich nachteilig auf die Entwicklung der Larven auswirken, wurden die Larven zu Beginn und am Ende des Versuches gewogen und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Exemplarisch ist in Abb. 15 die durchschnittliche Gewichtsentwicklung von *P. cochleariae* Larven vor und nach der Fütterung mit dem Phenol **35** und dem Glucosid **32** dargestellt. Es wird deutlich, dass sich keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtszunahme ergeben. Die verabreichten Substanzen hatten also keinen offensichtlichen Effekt auf die Fitness der Larven.

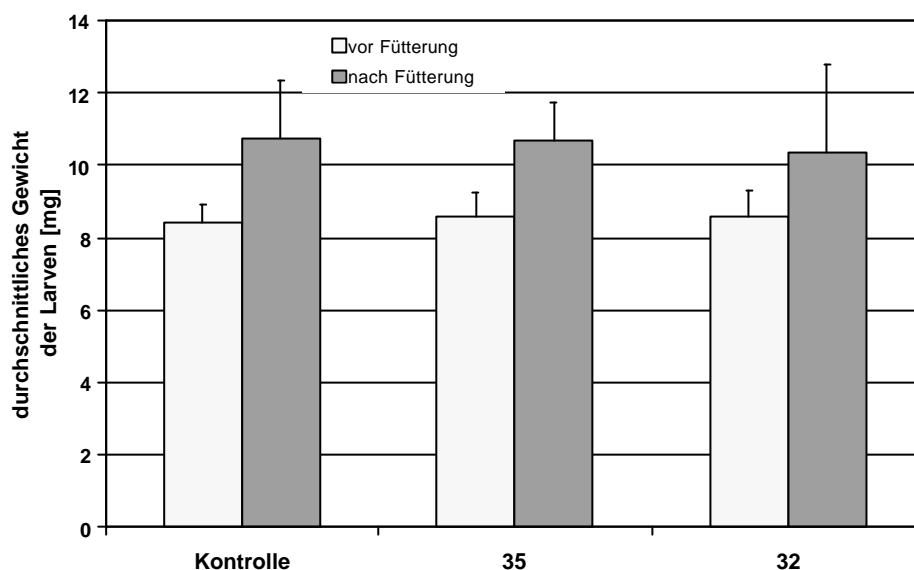


Abb. 15: Durchschnittliches Gewicht der Larven vor und nach der Fütterung mit p-Hydroxybenzaldehyd **35** bzw. p-Hydroxybenzaldehyd-O-glucosid **32**

Tabelle 2 fasst die Ergebnisse der bereits bekannten und der neuen Fütterungsexperimente zusammen.

Es konnte gezeigt werden, dass es tatsächlich einen selektiven Transport gibt, der eine Bevorzugung für die *o*-substituierten Substrate **7**, **21**, **22** und **23** zeigt. Im Falle des Salicins **20** und des Saligenins **21** geht die Substrat-Akzeptanz sogar so weit, dass der Alkohol **21**, sobald er frei im Reservoir vorliegt, vollständig von der Oxidase im Sekret umgesetzt wird. Es kann nur Salicylaldehyd **7** nachgewiesen werden. Nach der Fütterung mit den *m*- und *p*-substituierten Substanzen **25**, **26**, **27**, **28**, **32**, **33**, **35** und **36** werden die entsprechenden Phenole nicht im Sekret gefunden.

Überraschenderweise zeigt sich bei der Fütterung mit den Aglyconen genau dieselbe Selektivität wie für die Glucoside. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass sie von den Larven, z. B. beim Durchtritt durch die Membranen oder in der

Hämolymphe, glucosidiert werden und ihr Transport dann durch die Selektivität eines Glucosidtransporters bestimmt wird. Das ist allerdings nur eine Annahme, und muss genau überprüft werden.

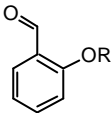
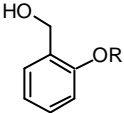
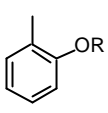
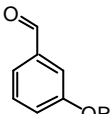
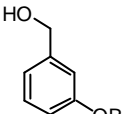
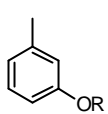
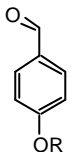
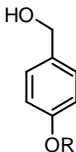
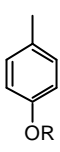
			
R=Glc	+ 22	+ 20 (Salicylaldehyd 7)	++ 23
R=H	+ 7	+ 21 (Salicylaldehyd 7)	++ 24
			
R=Glc	0 25	0 26	++ 30
R=H	0 27	0 28	++ 31
			
R=Glc	0 32	0 33	++ 34
R=H	0 35	0 36	++ 37

Tabelle 2: Nachweis von Phenolen im Wehrsekret von *P. cochleariae* nach Fütterung mit Phenolen und Phenolglucosiden (0 = nicht vorhanden; + = vorhanden; ++ = deutlich vorhanden)

Einen Unterschied erkennt man auch bei der Fütterung mit den Kresolen **24**, **31**, **37**

und den Kresol- *O*-glucosiden **23**, **30** und **34**. Die entsprechenden Kresole werden in deutlich größeren Mengen als die vorher beschriebenen Substanzen im Sekret gefunden. Außerdem gibt es keinerlei Selektivität bezüglich des Substitutionsmusters. Durch die fehlende Sauerstofffunktion im Gegensatz zu den anderen getesteten Substraten ist ein anderes Verhalten in der Larve durchaus zu erwarten. Es ist möglich, dass die Kresole durch Diffusion in die Reservoirs gelangen können, ohne glucosidiert zu werden. Das könnte auch für die Glucoside gelten, falls im Darm der Larven ein prinzipieller Mechanismus zur Spaltung von Glucosiden, wie ein saurer pH-Wert oder eine unspezifische Glucosidase, vorhanden ist. Weitere Untersuchungen, die diese Ergebnisse genauer beleuchten, sind aber nötig.

In der Folge sollte nun auch untersucht werden, ob andere Larven, wie *G. viridula*, die ebenfalls zu den *de novo* Produzenten gehören, vergleichbare Substratselektivität zeigen.

R=Glc	+ 22	+ 20 (Salicylaldehyd 7)	++ 23
R=H	+ 7	+ 21 (Salicylaldehyd 7)	++ 24
R=Glc	0 32	++ 34	++ 30
R=H	0 35	++ 37	++ 31

Tabelle 3: Nachweis von Phenolen im Wehrsekret von *G. viridula* nach Fütterung mit Phenolen und Phenolglucosiden (0 = nicht vorhanden; + = vorhanden; ++ = deutlich vorhanden)

Die durchgeführten Experimente, deren Ergebnisse in Tabelle 3 dargestellt sind, zeigen, dass sich auch für *G. viridula* dieselben Selektivitäten finden lassen.

Anhand der Selektivität für den Transport der o-substituierten Substrate, ist es zwar wahrscheinlich, dass es ein Transportsystem für die Glucoside gibt, ein endgültiger Beweis ist dies aber nicht. O-Glucoside sind leicht durch Glucosidasen spaltbar. Deshalb kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob die verfütterten Glucoside intakt oder erst nach Hydrolyse als Aglycone in die Reservoirs gelangt sind. Für weitere Untersuchungen sollten daher stabile Analoga gefunden werden.

3.4 Transport von Thioglucosiden

In dem Wehrsekret verschiedener Blattkäferlarven wurde β -Glucosidaseaktivität gemessen^[46,52]. Das gibt Grund zu der Annahme, dass die Vorstufen der Wehrsubstanzen glucosidisch gebunden in das Reservoir gelangen. Dafür ist aber ein aktives Transportsystem für Glucoside aus dem Darm in die Reservoirs nötig. Sollte sich herausstellen, dass nicht nur die Sequestrierer, sondern auch die *de novo* Produzenten über ein solches System verfügen, wäre das ein weiterer Beweis dafür, dass bereits in den archetypischen Larven alle nötigen Mechanismen vorhanden sind, um bei einem Wirtspflanzenwechsel glucosidisch gebundene Blattinhaltsstoffe wie das Salicin zu sequestrieren.

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass für weitere Untersuchungen der Transporteigenschaften von Glucosiden die Verwendung stabiler Analoga nötig ist, die nicht von Glucosidasen gespalten werden können. Für diese muss außerdem gelten, dass sie sich strukturell nur geringfügig von den zu untersuchenden Glucosiden unterscheiden. Dafür eignen sich z. B. C- und S-Glucoside. Sie sind beide stabil gegen O-Glucosidasen, und bislang ist nur eine einzige S-Glucosidase zur Spaltung von Glucosinolaten bekannt^[55-57]. Deshalb können sie im Darm der Larven nicht gespalten werden. Außerdem besitzen sie eine dem O-Glucosid sehr ähnliche Struktur, so dass sie beispielsweise von Transportproteinen als Substrat akzeptiert werden können. Synthetisch sind Thioglucoside einfacher zugänglich als C-Glucoside, so dass für die folgenden Experimente Thioglucoside verwendet wurden.

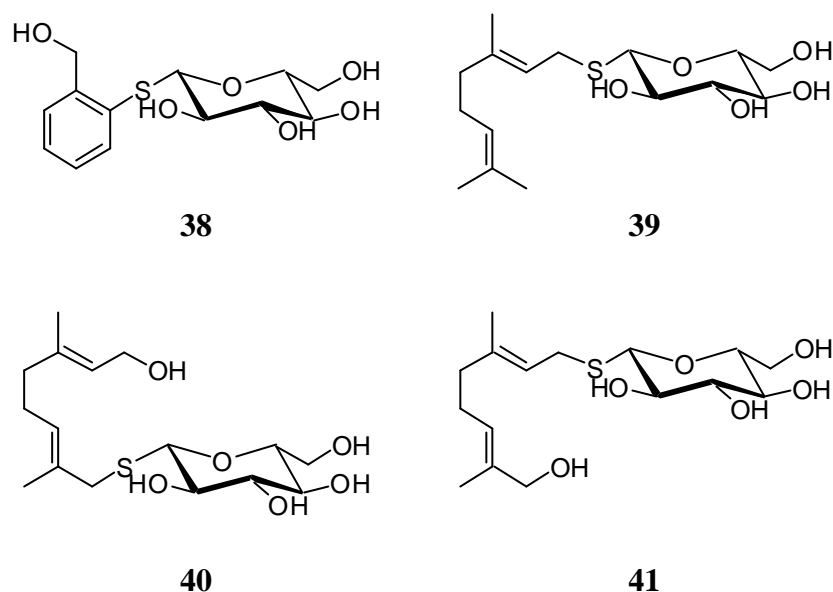


Abb. 16: Thioglucosid-Analoga der in der Biosynthese der Wehrsekrete vermuteten Glucoside

Es wurden die in Abb. 16 dargestellten Thioglucoside **38**, **39**, **40** und **41** synthetisiert. Es handelt sich dabei um die Thioanaloga der Glucoside, die als mögliche Vorstufen in der Biosynthese von Iridoiden und Salicylaldehyd **7** angenommen werden.

3.4.1 Kristallstruktur von Thiosalicin

Um sicher zu gehen, dass der Unterschied zwischen *O*- und *S*-Glucosiden tatsächlich nicht zu groß ist, wurde die bekannte Kristallstruktur von Salicin **20**^[58] mit der des Thiosalicins **38** verglichen. Um gute Kristalle von **38** zu erhalten, wurde es aus Ethanol umkristallisiert. Es entstanden große, farblose Nadeln.

Daraus ergeben sich für die (thio-) glucosidischen Bindungen die in Tabelle 4 dargestellten Werte.

	Bindungslänge [Å]		Bindungswinkel
	a	b	
$C_{ar} \overset{a}{\text{O}} \overset{b}{\text{C}}_{glc}$	1,390	1,411	117,7°
$C_{ar} \overset{a}{\text{S}} \overset{b}{\text{C}}_{glc}$	1,770	1,799	102,4°

Tabelle 4: Bindungslänge/-winkel von Salicin und Thiosalicin

Legt man beide Strukturen übereinander, erkennt man, dass sich die äußeren

Dimensionen der Moleküle nicht sehr unterscheiden.

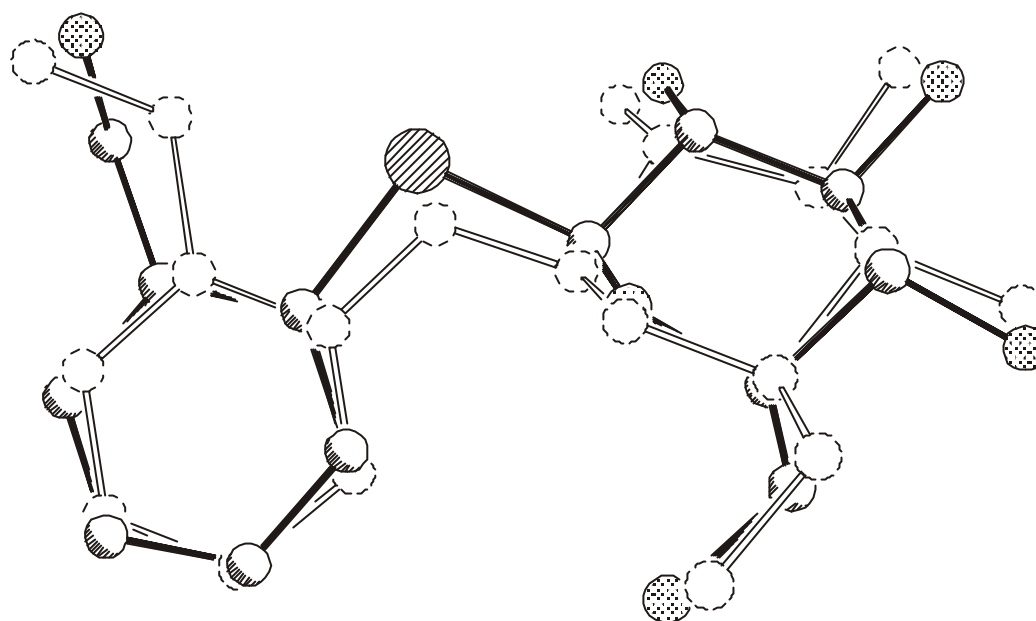


Abb. 17: Vergleich zwischen Thiosalicycin **38** (fett) und Salicycin **20** (gestrichelt)

In Abb. 17 stehen die Benzylalkoholgruppen in völlig entgegengesetzte Richtungen. In Lösung sind diese Gruppen aber frei drehbar, so dass dieser Unterschied keine Rolle spielt.

Natürlich wirkt sich der Austausch eines O- gegen ein S-Atom auch auf die Elektronendichte im Aromaten aus. Sauerstoff übt zwar wegen seiner Elektronegativität einen negativen induktiven Effekt (-I-Effekt) auf den Aromaten aus. Dieser wird allerdings von einem positiven mesomeren Effekt (+M-Effekt) übertroffen, der dadurch zustande kommt, dass sich die freien Elektronenpaare des Sauerstoffs in 2p-Orbitalen befinden, die gut mit den δ -Orbitalen des Aromaten überlappen können.

Schwefel dagegen übt zwar einen schwächeren -I-Effekt aus, kann aber auch nur einen sehr schwachen +M-Effekt ausüben, da sich die freien Elektronenpaare in 3p-Orbitalen befinden, die nur zu einer sehr schwachen Überlappung mit den δ -Orbitalen des Aromaten in der Lage sind.

Dadurch ist die Elektronendichte im Aromaten in Salicycin **20** größer als in Thiosalicycin **38**^[59].

3.4.2 Detektion der Thioglucoside mittels LC-MS

Um die Thioglucoside auch im Sekret nachweisen zu können, musste zunächst eine Methode entwickelt werden, die zwei Bedingungen zu erfüllen hatte:

1. wenige Schritte bei der Probenvorbereitung, um Verluste zu vermeiden
2. hohe Empfindlichkeit bei der Detektion

Dafür bot sich eine Kopplung von Flüssig-Chromatographie mit Massenspektrometrie an. Abb. 18 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Gerätes.

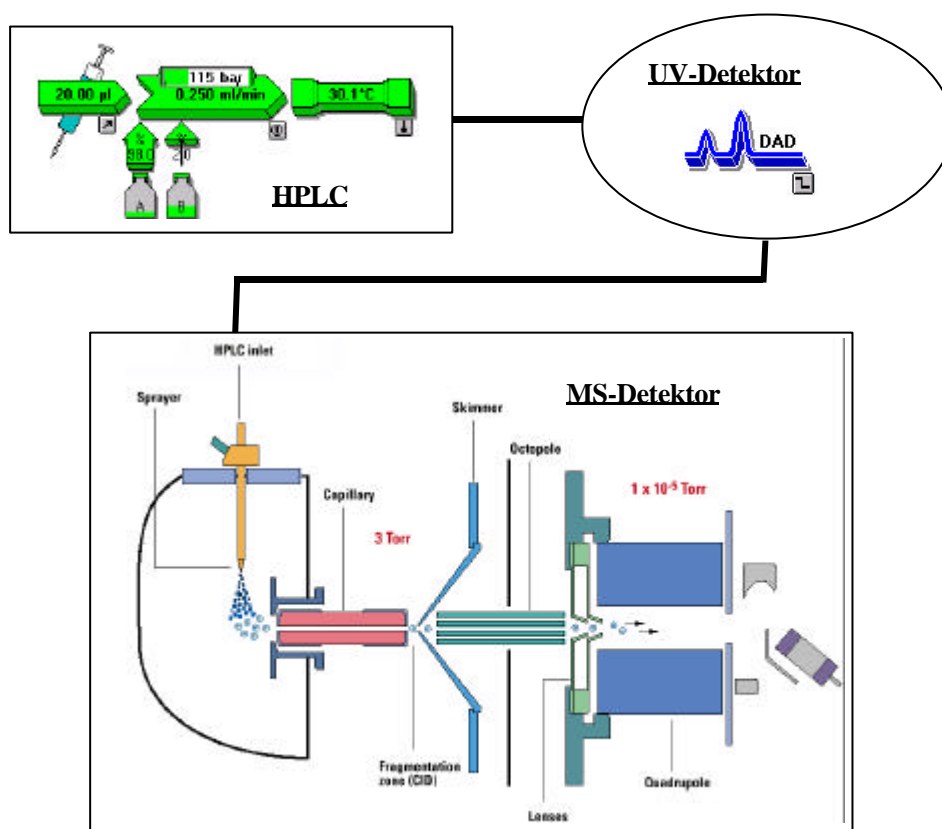


Abb. 18: Systematische Darstellung eines LC-MS-Systems ^[60]

Durch die Verwendung einer HPLC mit geeigneten Vorsäulen war ein zusätzliches Aufreinigen der Sekret- und Hämolympfproben nicht nötig. Sie wurden lediglich in einem Gemisch aus Wasser/Methanol aufgenommen und zentrifugiert, um feste Partikel, die die Kapillaren verstopfen könnten, abzutrennen. Durch die Nutzung eines Autosamplers war es möglich, einen hohen Probendurchsatz zu erzielen.

Bei den Thioglucosiden **38**, **39**, **40** und **41** handelt es sich um Substanzen, die einen polaren und einen unpolaren Teil besitzen. Als geeignetes Säulenmaterial für die

Chromatographie derartiger mittelpolarer Substanzen stellte sich eine C₁₈-Siloxan Umkehrphase (Reversed Phase = RP) heraus. Da zu erwarten war, dass es sich um sehr geringe zu detektierende Substanzmengen handeln würde, wurde eine Säule mit kleinen Ausmaßen (Porengröße=3 µm, Dimensionen=125*2 mm) verwendet. Das ermöglichte die Verwendung von kleinen Flussraten (0,25 ml/min), wodurch die Probe so wenig wie möglich verdünnt wurde. Als Laufmittel diente ein Wasser/Acetonitrilgemisch, das mit 0,5 % Essigsäure versetzt war. Die Elution wurde mit einem Gradienten, beginnend mit 2 % Acetonitril durchgeführt. Innerhalb von 20 Minuten wurde der Anteil von Acetonitril auf 100 % erhöht. Die Thioglucoside hatten folgende Retentionszeiten (Tabelle 5):

Substanz	Retentionszeit [min]
38	10,2
39	13,9
40	9,2
41	9,3

Tabelle 5: Retentionszeiten der Thioglucoside bei RP-HPLC (Gradient (MeCN+CH₃COOH): 2 % - Erhöhung auf 100% über 20 min)

Die Detektion erfolgte zunächst per UV. Für die Detektion von Thiosalicin **38** wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen. Das entspricht der α -Bande des Aromaten. Die Thioglucoside **39**, **40** und **41** wurden mittels eines DAD vermessen. Das hatte den Vorteil, dass bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig gemessen werden konnte. Es stellte sich heraus, dass das Absorptionsmaximum der drei Thioglucoside bei 224 nm liegt. Diese Absorption befindet sich im Bereich des $n \rightarrow \sigma^*$ -Überganges des Schwefels.

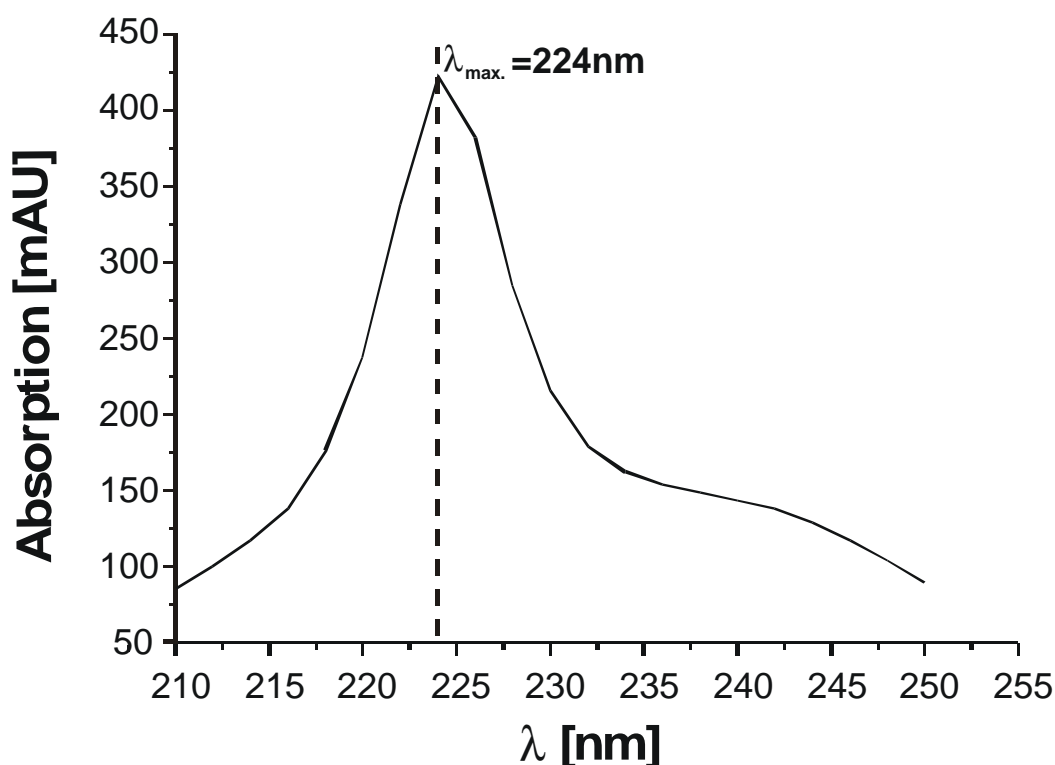


Abb. 19: UV-Spektrum von Thioglucosid **40** mit Absorptionsmaximum bei 224 nm

Da sich die UV-Absorption eines Stoffes bei einer definierten Wellenlänge nach dem Lambert-Beerschen Gesetz linear zur Konzentration verhält, konnte der Gehalt der Thioglucoside über die UV-Spur bestimmt werden^[61].

Die anschließende Kopplung mit der MS war möglich, da es sich bei der UV-Detektion um eine zerstörungsfreie Messmethode handelt. Sie wurde benötigt, um den gesuchten Analyten einwandfrei über die Korrelation von Retentionszeit und MS-Spektrum in der Probenmatrix nachweisen zu können.

In dem daraus resultierenden Chromatogramm ergibt sich eine geringe Verschiebung der Retentionszeiten im Vergleich zu der UV-Spur (Abb. 20). Diese wird bestimmt von dem Volumen der Verbindungskapillare zwischen UV- und Massendetektor und ist bei einer gegebenen Gerätekonfiguration konstant, so dass sich die Verschiebung durch die Messung eines Standards bestimmen lässt.

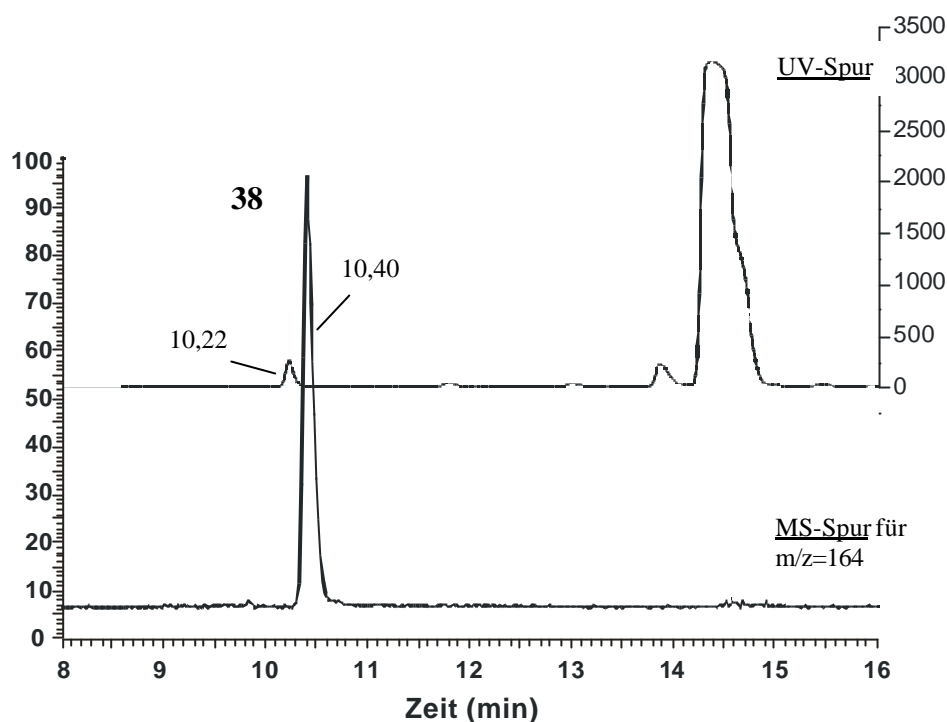
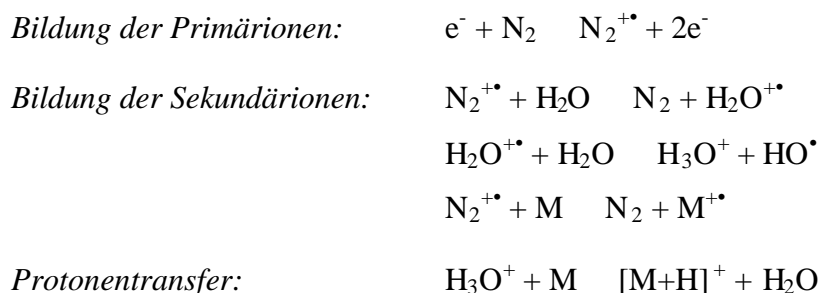


Abb. 20: Vergleich der UV- und der MS-Spur für die Detektion von Thiosalicin **38** im Wehrsekret von *P. cochleariae*

Für die Proben-Ionisation standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Elektrospray-Ionisation (ESI) und chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric pressure chemical ionisation = APCI). Bei ESI handelt es sich um eine sehr sanfte Methode, die besonders für große Moleküle, wie Proteine und Peptide verwendet wird. Auch bei der APCI handelt es sich um eine schonende Ionisationsmethode, die hauptsächlich zur Ionisierung mittelpolarer, nicht leichtflüchtiger Substanzen mit Molgewichten bis zu 2000 Da benutzt wird^[62]. In unserem Fall zeigte sich, dass die APCI besser zur Detektion der Thioglucoside geeignet ist, da sich eine höhere Empfindlichkeit erreichen lässt.

Bei dieser Technik wird die Probe durch eine feine Düse vernebelt und dann verdampft. Durch eine Glimmentladung werden die Ionen erzeugt. Dabei finden eine Reihe chemischer Reaktionen mit Lösemittelmolekülen und dem Reaktandgas Stickstoff statt. Einige der Reaktionen, die zur Ionisierung des Probenmoleküls führen, sind hier dargestellt:



Um eine größtmögliche Empfindlichkeit zu erzielen, wurden die Geräteeinstellungen so gewählt, dass sie optimal auf den jeweiligen Analyten abgestimmt waren. So waren diese noch im nM-Bereich detektierbar.

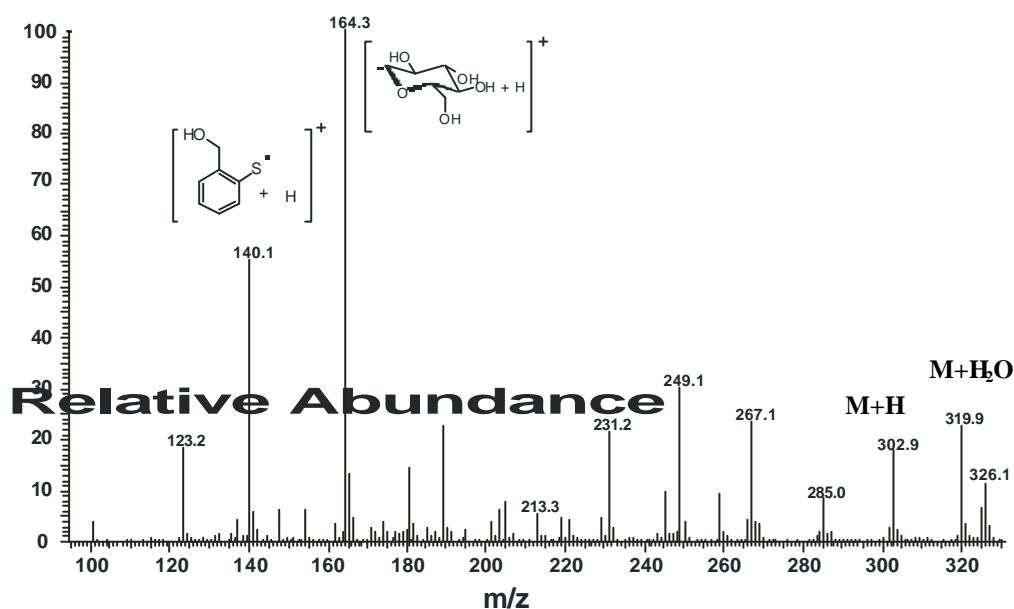


Abb. 21: APCI-MS von Thiosalicin 38

Abb. 21 zeigt ein Massenspektrum von Thiosalicin 38. Es ist deutlich das Ion $[M+H]^+ = 302.9$ zu erkennen. Außerdem gibt es zwei Ionen, die durch Reaktion mit Lösemittelmolekülen entstanden sind, nämlich $[M+H_2O]^+ = 319.9$ und $[M+MeCN-H_2O]^+ = 326.1$. Alle fünf Alkoholgruppen werden in Form von Wasser abgespalten. Daraus ergibt sich folgende Zerfallsserie:



Das Basis-Ion 164.3 und das Fragment 140.1 entstehen, wie in Abb. 22 gezeigt, aus der Spaltung der thioglucosidischen Bindung:

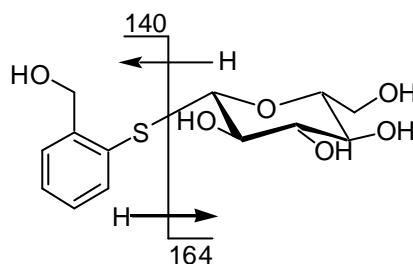


Abb. 22: Fragmentierung von Thiosalicin **38** im APCI-MS

Das Fragment $m/z = 123.2$ entsteht durch Abspaltung eines OH-Radikals aus dem Fragment $m/z = 140$.

Für die Geranylthioglucoside **39**, **40** und **41** ergeben sich etwas andere Spektren, wie in Abb. 23 beispielhaft an Verbindung **40** gezeigt wird.

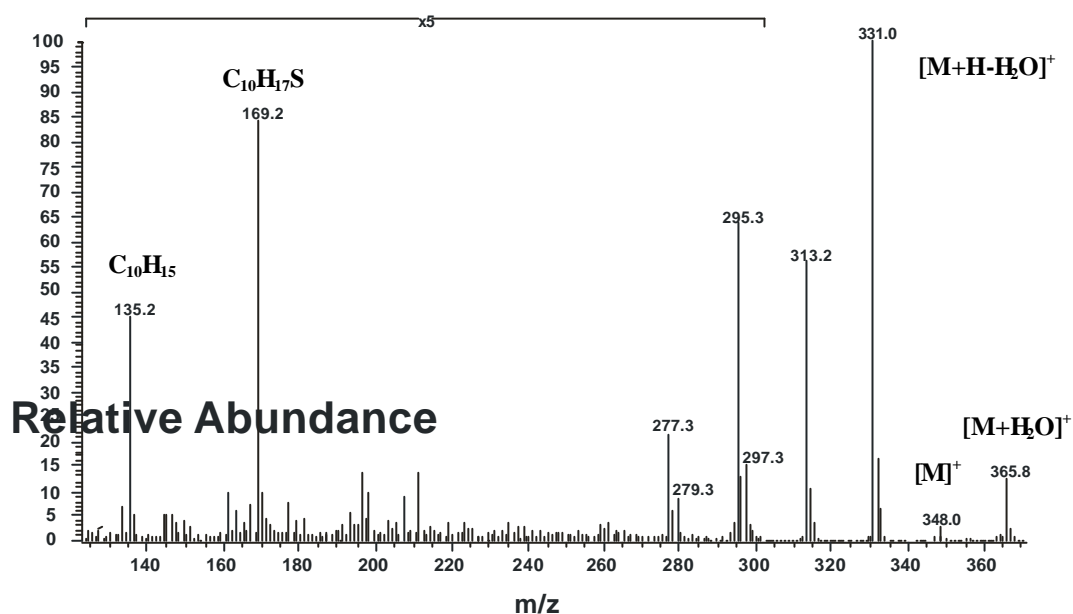


Abb. 23: APCI-MS von Thioglucosid **40**

Das Molekülion $M^+ = 348$ ist schwach sichtbar. Außerdem erkennt man die Anlagerung eines Lösemittelmoleküls zu $[M+H_2O]^+ = 365.8$.

Basispeak ist $[M+H-H_2O]^+ = 331$. Die folgenden Fragmente entstehen durch weitere Wasserabspaltungen:

$$331.0 @ 313.2 @ 295.3 @ 277.3$$

Die Abspaltung von Wasser aus dem Geranylrest, führt wahrscheinlich zu einem

thermodynamisch stabilen Dien, wie es in Abb. 24 dargestellt ist. Das kann dann in die zwei analytisch wichtigen Fragmente $m/z = 169$ und $m/z = 135$ zerfallen.

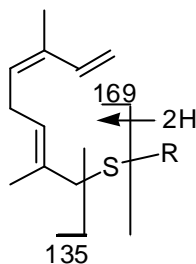


Abb. 24: Wichtige Fragmente des Thioglucosids **40** im APCI-MS

3.4.3 Verträglichkeit von Thiosalicin **38** für Larven von *P. cochleariae*

Thioglucoside sind bekannt als Glucosidase-Inhibitoren^[56,57]. Das heißt, die Applikation von Thioglucosiden an Blattkäferlarven kann einen enormen Einfluss auf die Fitness der Larven haben. Diese äußert sich besonders in der Gewichtszunahme der Larven und der Zeit, die sie benötigen, bis sie sich verpuppen.

Deshalb wurde in einem Experiment eine Gruppe von 10 *P. cochleariae* Larven, die zwischen fünf und sieben Tagen alt waren, auf einem mit Thiosalicin **38** behandelten Blatt gehalten. Sie wurden im Verlauf des Experiments täglich einmal gewogen. Gleichzeitig wurde eine Kontrollgruppe von je 10 Larven unter den gleichen Bedingungen auf einem unbehandelten Blatt gezogen.

Während des Experiments, das über einen Zeitraum von 236 Stunden verlief, starben in der Kontrollgruppe zwei Larven, während in der Versuchsgruppe alle Larven überlebten. In Abb. 25 sieht man, dass sich die Larven beider Gruppen zuerst identisch entwickeln. Erst nach etwa 140 h wirkt sich die Fütterung mit Thiosalicin **38** geringfügig nachteilig auf die Larven aus. Trotzdem konnten sich alle Larven verpuppen. Es wurde nicht weiter beobachtet, wie viele Imagines schlüpften. Da alle folgenden Experimente in einem Zeitraum von maximal 48 h durchgeführt wurden, gibt es keine störenden Fitnesseinbußen für die Larven, die berücksichtigt werden müssten.

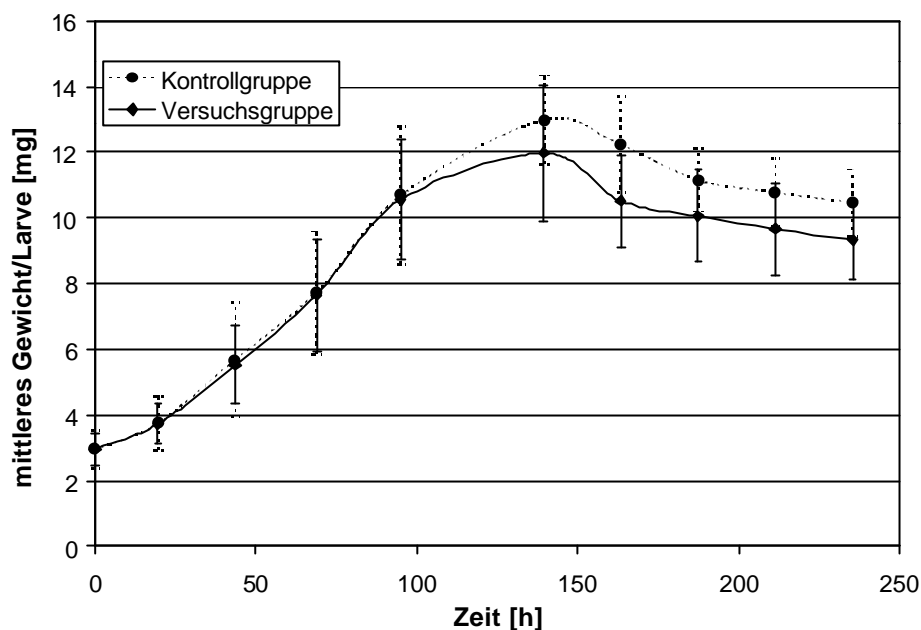


Abb. 25: Gewichtsentwicklung von *P. cochleariae* Larven bei Fütterung mit Thiosalicin **38**

Das gleiche Experiment wurde ebenfalls mit **39** und **40** durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass die Thioglucoside keinen Einfluß auf die Entwicklung von *Ph. armoraciae* Larven haben.

3.4.4 Abnahme von Wehrsekret und Hämolymphe

In den folgenden Experimenten wurden Glaskapillaren verwendet, um das Wehrsekret und die Hämolymphe der Larven zu sammeln. Dafür wurden Schmelzpunktröhrchen über einem Gasbrenner fein ausgezogen.

Um das Sekret zu sammeln, wurden die Larven unter dem Stereomikroskop mit einer Pinzette so festgehalten, dass sie als Stressreaktion die Reservoirs mit den Wehrsubstanzen ausstülpten. Mit Hilfe einer Kapillare wurden dann die Sekrettröpfchen gesammelt, wobei darauf geachtet wurde, kein Sekret aufzunehmen, das Kontakt mit dem Rücken der Larve hatte.

Die Hämolymphe konnte nur von toten Larven gesammelt werden. Dazu wurden sie für 10 min bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden sie in destilliertem Wasser gewaschen, um Kontaminationen zu vermeiden. Durch das Abschneiden eines Beines trat Hämolymphe aus, die wieder in einer Kapillare gesammelt wurde.

Die Menge des gesammelten Sekrets und der Hämolymphe wurde über

Differenzwägungen der Kapillaren bestimmt.

Von sechs Larven erhielt man ungefähr 100-150 µg Sekret. Da Larven von *C. populi* deutlich mehr Sekret abgeben, reichten bereits drei Larven, um die gleiche Menge zu erhalten. Die Menge der von zwei Larven gesammelten Hämolymphe betrug etwa 1000-1500 µg.

3.4.5 Qualitative Übersicht

In einem vorbereitenden Experiment sollte untersucht werden, ob Blattkäferlarven verschiedener Spezies in der Lage sind, die vier verschiedenen Thioglucoside **38**, **39**, **40** und **41** in ihr Wehrsekret zu transportieren, wenn sie ihnen über den Fraß angeboten werden. Das wurde sowohl an Sequestrierern als auch an *de novo* Produzenten getestet. Sie wurden etwa zwei Tage lang auf Blättern gehalten, die mit den Substraten imprägniert waren. Dann wurde ihnen, wie oben beschrieben, Sekret und Hämolymphe abgenommen. Diese Proben konnten über LC-MS analysiert werden. Um genügend Substanz für eine eindeutige Analyse zu erhalten, wurden für die Sekretproben je sechs bis acht Larven zusammengenommen und für die Hämolympheproben je zwei.

Tabelle 6 zeigt, dass das Geranylthioglucosid **39** bei allen Larven nur gerade an der Nachweisgrenze gefunden werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass es sich dabei nicht um einen Transport vom Darm in das Wehrsekret handelt, sondern um eine Kontamination, die gegebenenfalls dadurch zu Stande kommt, dass die Larven durch das Ausstülpfen ihrer Drüsen Substrat von dem mit **39** imprägnierten Blatt abstreifen können.

Dagegen wurden die etwas polaren Thioglucoside des Hydroxygeraniols **40** und **41** von allen Larven transportiert. Das zeigt, dass offensichtlich ein Transportsystem existiert, das eine gewisse Substratspezifität bezüglich der Polarität des Thioglucosids zeigt.

Der Transport des Thiosalicins **38** ist lediglich bei *P. laticolis* ausgeschlossen. Das war durchaus zu erwarten, da *P. laticolis* zwar auf salicinhaltiger Weide lebt, aber nicht in der Lage ist, Salicin **20** zu sequestrieren. Trotzdem scheinen diese Larven aber über ein Transportsystem für Terpenoide zu verfügen, da die Thioglucoside **40** und **41** in ihrem Sekret gefunden werden. Offensichtlich bedeutet es einen

evolutiven Vorteil für sie, nicht die „billigere“ Sequestrierung für ihre Wehrchemie zu nutzen, obwohl sie alle Voraussetzungen dafür besitzen. Denkbare Gründe dafür sind, wie schon in der Einleitung dargestellt, die höhere Flexibilität bei einem Wirtspflanzenwechsel. Außerdem bewirkt eine größere Diversität der Wehrsubstanzen einen Vorteil für die verschiedenen Blattkäferlarvenarten, die auf der gleichen Wirtspflanze leben. Denn Fraßfeinde sind zu einer größeren Anpassung gezwungen, wenn sie sich verschiedenen Wehrsubstanzen gegenüber sehen. Außerdem lässt sich das Wehrsekret auch interspezifisch einsetzen, um aus dem Konkurrenzkampf um die Fraßpflanze als Sieger hervorzugehen.

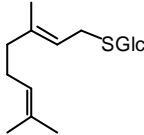
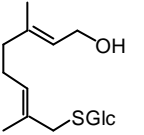
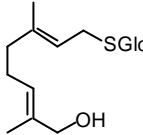
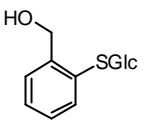
	 39		 40		 41		 38	
	S	H	S	H	S	H	S	H
<i>C. populi</i> (<i>Populus</i>) SA	tr	tr	+	+	+	+	++	+
<i>P. vitellinae</i> (<i>Salix</i>) SA	tr	tr	+	+	+	tr	+	+
<i>P. laticolis</i> (<i>Salix</i>) IM	tr	tr	+	+	+	tr	0	0
<i>P. cochleariae</i> (<i>Armoracia</i>) IM	tr	tr	+	+	+	+	+	+
<i>G. viridula</i> (<i>Rumex</i>) IM	tr	tr	+	+	+	+	+	+

Tabelle 6: Transport der Thioglucoside **38**, **39**, **40** und **41** in Sekret (S) und Hämolymphe (H) (Wirtspflanze in Klammern; SA = Salicylaldehydproduzent; IM = Iridoidmonoterpenproduzent; 0 = nicht gefunden; tr = an der Nachweisgrenze; + = deutlich nachweisbar; ++ = sehr viel enthalten)

Für *C. populi* wurde eine absolut größere Menge an Thiosalicin **38** im Wehrsekret wiedergefunden als bei allen anderen Spezies. Dieses Ergebnis reicht allerdings noch nicht für eine Einschätzung der Konzentration von **38** im Sekret aus, da die einzelnen Larven deutlich mehr Sekret abgegeben haben als die anderen Spezies, was bei der Darstellung nicht berücksichtigt wurde.

3.4.6 Konkurrenzfütterung von **38** und **39**

Tabelle 6 im vorhergehenden Kapitel zeigt, dass das Thioglucosid **39** von keiner der getesteten Larven, seien es Sequestrierer oder *de novo* Produzent, aus dem Darm in das Wehrsekret transportiert werden kann. Dafür kann es zwei Gründe geben. Zum einen ist es möglicherweise nicht polar genug und wird deshalb nicht von dem Transportsystem akzeptiert. Ein weiterer Grund könnte aber sein, dass es den Transporter inhibiert.

Um das zu überprüfen, wurden *P. cochleariae* Larven mit einer Mischung der Thioglucoside **38**, das sie in deutlichen Mengen in ihrem Wehrsekret akkumulieren, und **39** gefüttert. Nach zwei Tagen wurde ihnen Sekret und Hämolymphe abgenommen und per LC-MS untersucht.

Da beide Substanzen bei unterschiedlichen Ionisationsbedingungen detektiert werden müssen, um eine höchstmögliche Empfindlichkeit zu erreichen, wurde ein Programm gewählt, bei dem nach 11,5 min, nachdem **38** eluiert ist, die Geräteparameter verändert wurden.

Es zeigte sich, dass nach wie vor Thiosalicin **38** sowohl im Sekret als auch in der Hämolymphe gefunden werden kann, während das Thiogeranylglucosid **39** nicht nachzuweisen war.

39 inhibiert also nicht den Transport von Glucosiden aus dem Darm in das Wehrsekret.

Es ist vielmehr davon auszugehen, dass es sich um einen spezialisierten Transporter handelt, der nur die Aufnahme von Glucosiden zulässt, die in den Fraßpflanzen vorkommen können.

3.4.7 Kinetische Untersuchung des Thioglucosid-Transports

Nach den vielversprechenden Voruntersuchungen, die in 3.4.5 dargestellt worden sind, sollte im Folgenden geklärt werden, wie effektiv die verschiedenen Spezies die unterschiedlichen Thioglucoside **38**, **40** und **41** in einem bestimmten Zeitraum transportieren können. Als Vertreter für sequestrierende Larven wurden *C. populi* und als Vertreter für *de novo* Produzenten *P. cochleariae* und *G. viridula* verwendet.

12 bis 14 Tage alte Larven wurden zum Zeitpunkt $t=0$ auf die mit dem jeweiligen Thioglucosid imprägnierten Blätter gesetzt. In dreistündigen Abständen wurde jeweils von sechs Larven Sekret abgenommen, gewogen und in 40 μ l Lösemittel (Wasser/Methanol 1:1) aufgenommen. Per LC-MS wurde mit Hilfe einer vorher gemessenen Eichkurve die Menge des enthaltenen Thioglucosids bestimmt. Für die Untersuchungen der Hämolymphe wurden jeweils zwei Larven verwendet.

Quantifizierung von Thiosalicin **38**

Wie erwartet, war der Sequestrierer *C. populi* in der Lage, Thiosalicin **38**, das Analogon seines natürlichen Substrats Salicin **20**, sehr schnell im Wehrsekret anzureichern (Abb. 26).

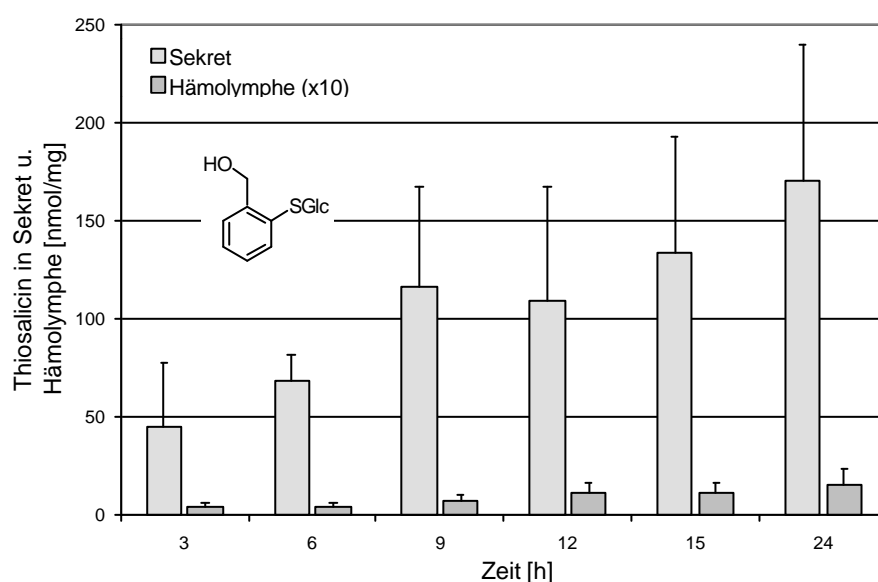


Abb. 26: Anreicherung von Thiosalicin **38** in Wehrsekret und Hämolymphe von *C. populi* (Konzentration von **38** in Hämolymphe wurde mit 10 multipliziert, um es im Diagramm sichtbar machen zu können.)

Im Vergleich dazu zeigen Abb. 27 und Abb. 28, dass die beiden *de novo*

Produzenten *P. cochleariae* und *G. viridula* **38** bei weitem nicht so effektiv transportieren können. Im gleichen Zeitraum reicherten sie nur ein Zehntel des Thioglucosids **38** in ihrem Wehrsekret an. Weiterhin fällt auf, dass auch zwischen diesen beiden Spezies deutliche Unterschiede zu erkennen sind. Während *P. cochleariae* nach 15 h etwa $12 \text{ nmol}_{\text{38}}/\text{mg}_{\text{(Sekret)}}$ angereichert hat, erreicht *G. viridula* in der gleichen Zeit nur knapp $2 \text{ nmol}_{\text{38}}/\text{mg}_{\text{(Sekret)}}$.

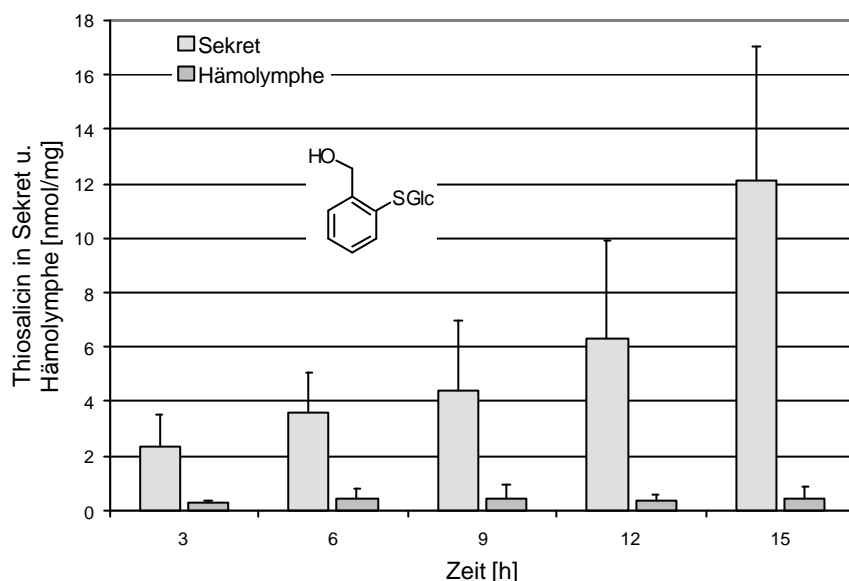


Abb. 27: Anreicherung von Thiosalicycin **38** in Wehrsekret und Hämolymphe von *P. cochleariae*

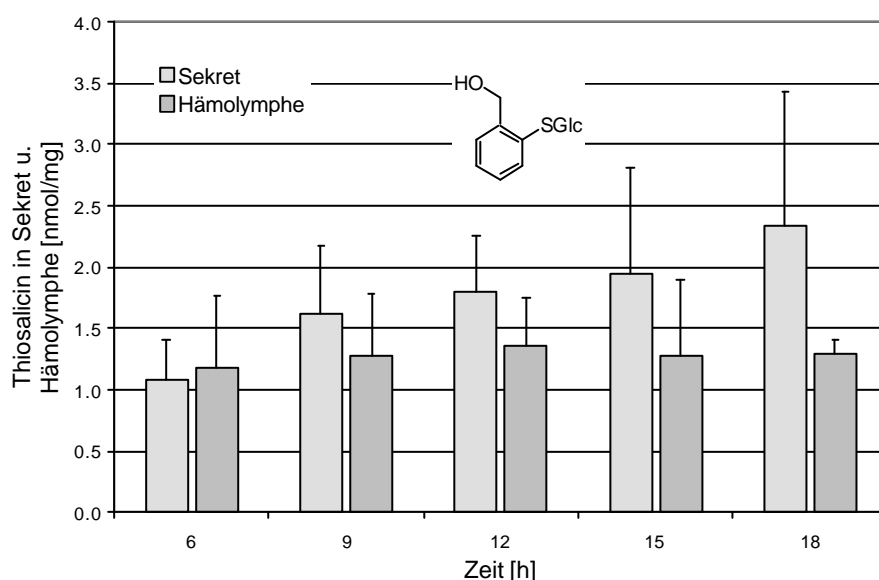


Abb. 28: Anreicherung von Thiosalicycin **38** in Wehrsekret und Hämolymphe von *G. viridula*

Bei allen drei Spezies bleibt aber die Menge des Thioglucosids **38**, das in der Hämolymphe gefunden wird, konstant im Bereich zwischen 1 bis

2 nmol₍₃₈₎/mg_(Hämolymphe). Sie dient offensichtlich nur als ein Transportmedium, in dem es zu keiner Anreicherung von **38** kommt.

Die seit langem diskutierte Frage, ob das aus der Pflanze aufgenommene Salicin **20** in sequestrierenden Larven, wie *P. vitellinae* oder *C. populi*, als Glucosid oder als Aglycon in die Reservoirs gelangt, konnte mit diesen Versuchen beantwortet werden. Es zeigt sich, dass ein Transportsystem für Glucoside existieren muss, da die applizierten Thioglucoside zu polar sind, als dass sie durch Diffusion aus dem Darm in das Wehrsekret der Larven gelangen könnten.

Quantifizierung von 8-Mercaptogeraniol-1'-thio-**b**-D-glucosid **40**

Bei der Fütterung mit dem Thioglucosid **40** stellt sich ein umgekehrtes Bild dar. Wegen der Saisonabhängigkeit der Larven war *C. populi* leider nicht mehr für eine vollständige kinetische Messung verfügbar. Die in Abb. 29 dargestellten Ergebnisse reichen aber aus, um erkennen zu lassen, dass *C. populi* zwar in der Lage ist, auch dieses Thioglucosid zu sequestrieren, allerdings nur in sehr eingeschränktem Maß. Der strukturelle Unterschied zu Salicin **20** scheint zu groß zu sein, als dass es noch zu einem effektiven Transport kommen kann.

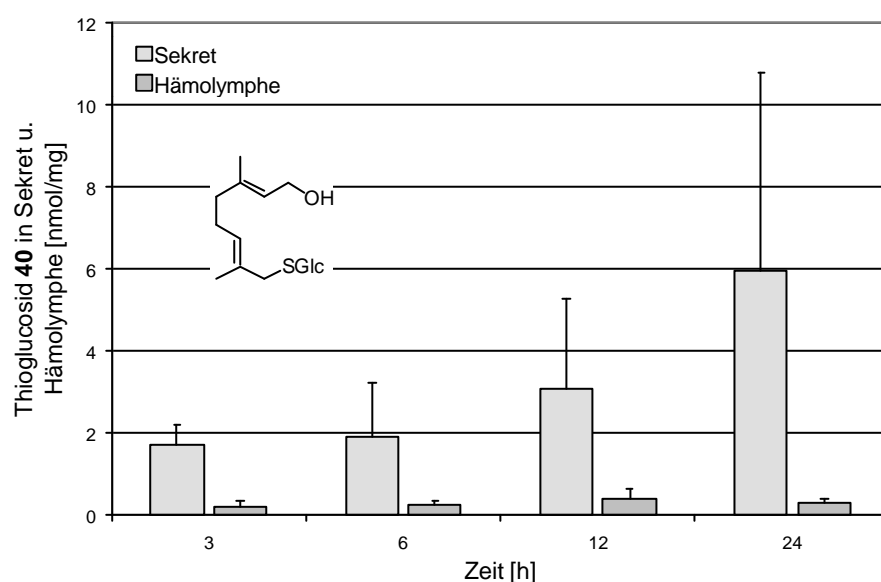


Abb. 29: Anreicherung von Thioglucosid **40** in Wehrsekret und Hämolymphe von *C. populi*

Dagegen zeigen Abb. 30 und Abb. 31, dass sowohl *P. cochleariae* als auch *G. viridula* in der Lage sind, **40** in deutlich größerem Maße vom Darm in das Wehrsekret zu transportieren. Innerhalb von 24 h kommt es zu einer Anreicherung von 60 bis 80 nmol₍₄₀₎/mg_(Sekret).

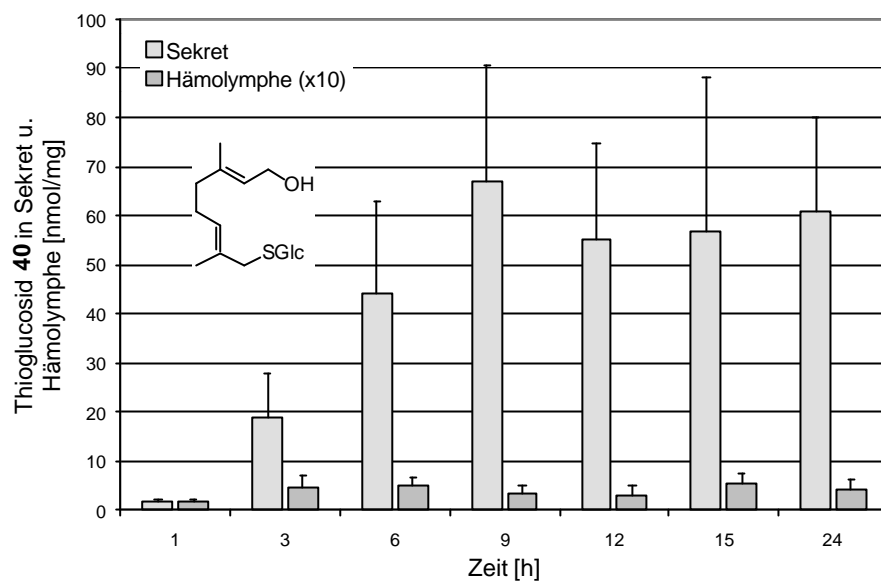


Abb. 30: Anreicherung von Thioglucosid **40** in Wehrsekret und Hämolymphe von *P. cochleariae* (Konzentration von **38** in Hämolymphe wurde mit 10 multipliziert, um es im Diagramm sichtbar machen zu können.)

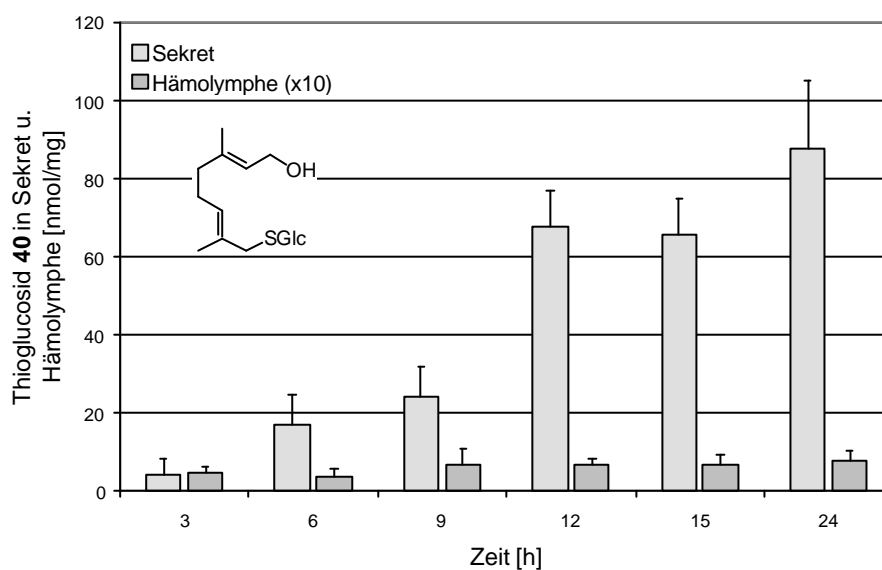


Abb. 31: Anreicherung von Thioglucosid **40** in Wehrsekret und Hämolymphe von *G. viridula* (Konzentration von **38** in Hämolymphe wurde mit 10 multipliziert, um es im Diagramm sichtbar machen zu können.)

Vergleicht man diese Werte mit dem Transport von Thiosalicin **38** bei *C. populi* (Abb. 26), sieht man, dass die Absolutmenge an akkumuliertem **40** bei den Iridoidproduzierenden Larven zwar nur etwa halb so hoch ist, es handelt sich aber trotzdem um ein effektives Transportsystem zur Aufnahme der Vorstufen der Wehrsubstanzen.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch die Larven von *P. cochleariae* und *G.*

viridula, die bislang als reine *de novo* Produzenten betrachtet wurden, Sequestrierer sein können.

Auch bei diesen Experimenten ist festzuhalten, dass es zu keiner Anreicherung des Substrates in der Hämolymphe kommt, sie also nur als Transportmedium dient.

Quantifizierung von 8-Hydroxythiogeraniol-1'-thio-**b**-D-glucosid **41**

Nach diesem überraschenden Ergebnis war es interessant herauszufinden, wie selektiv das Transportsystem in *P. cochleariae* und *G. viridula* ist. Darum wurde das Thioglucosid **41**, das sehr große strukturelle Ähnlichkeit mit **40** aufweist, an die Larven verfüttert und nach sechs und zwölf Stunden der Gehalt in Wehrsekret und Hämolymphe bestimmt.

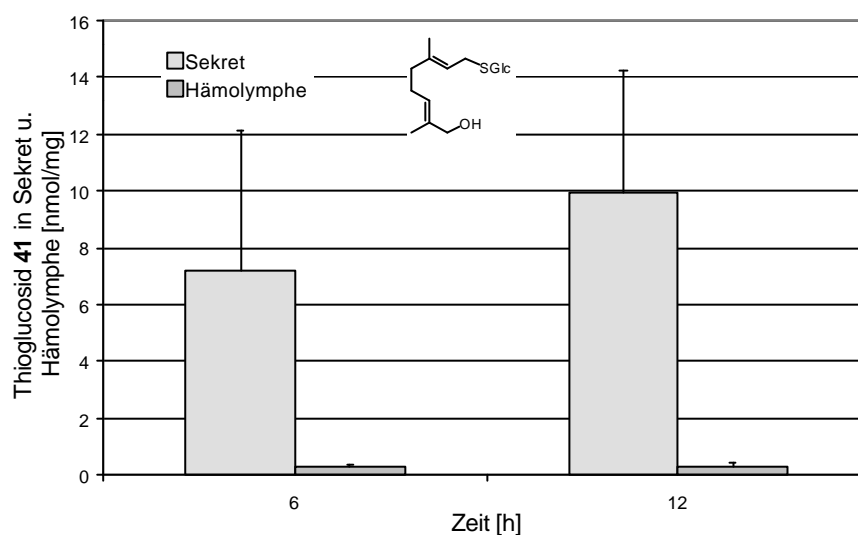


Abb. 32: Anreicherung von Thioglucosid **41** in Wehrsekret und Hämolymphe von *P. cochleariae*

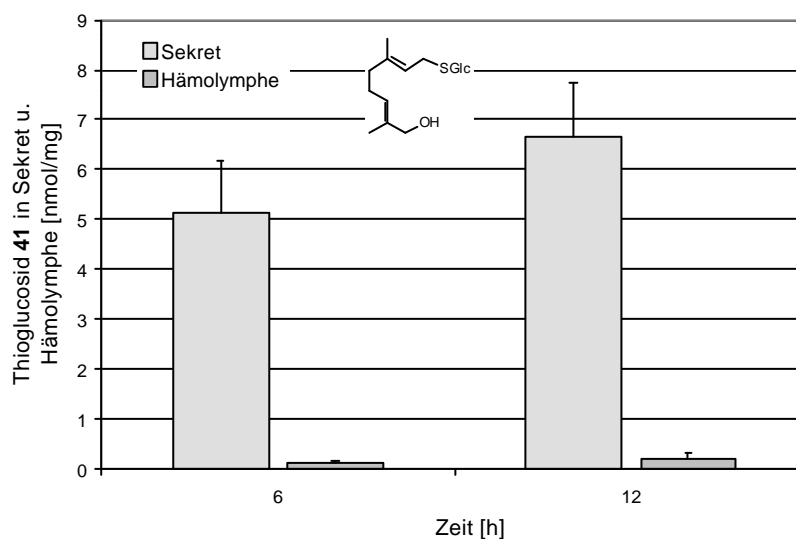


Abb. 33: Anreicherung von Thioglucosid **41** in Wehrsekret und Hämolymphe von *G. viridula*

Es ist festzustellen, dass, verglichen mit **40**, eine wesentlich geringere Menge des Thioglucosids **41** in die Drüsen gelangt (Abb. 32, Abb. 33). Beide Moleküle besitzen die gleiche Polarität. Sie unterscheiden sich aber strukturell in der Position der Methylgruppen relativ zur glucosidischen Bindung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem Transporter in *P. cochleariae* und *G. viridula* Larven nicht um ein unspezifisches System zur Aufnahme von Glucosiden handelt. Es besitzt eine sehr hohe Substratspezifität, die nur die Sequestrierung des 8-Hydroxygeranylglucosids **13** zulässt, das auch schon von Daloze und Pasteels im Wehrsekret von *P. versicolora* und *G. viridula* nachgewiesen wurde^[39]. Sie gingen davon aus, dass es wahrscheinlich als Transportform für den Transfer der Iridoidvorstufen aus den Wehrdrüsen in die Reservoirs dient. Möglicherweise enthalten aber auch schon die Blätter der Fraßpflanzen einen gewissen Anteil von **13**, auf deren Sequestrierung sich die Larven spezialisiert haben.

Bislang ging man davon aus, dass es sich bei den *de novo* Produzenten um einen Archetypus handelt, aus dem dann die Sequestrierer hervorgegangen sind, da bereits das Rüstzeug – ein Transportsystem für Glucoside (oben gezeigt), eine relativ unspezifische Glucosidase und eine Oxidase – für eine solche Weiterentwicklung vorhanden war^[47]. Nach den hier vorgestellten neuen Ergebnissen stellt sich allerdings die Frage, ob es sich nicht viel mehr bei den Sequestrierern um den Archetypus handelt. Durch evolutiven Druck, beispielsweise ein abnehmender Gehalt an glucosidischen Vorstufen in der Wirtspflanze, könnte es zur Entwicklung der *de novo* Produktion der Wehrsubstanzen gekommen sein. Da die Fähigkeit zur Sequestrierung nicht vollständig verloren gegangen ist, war die erneute Nutzung des bereits vorhandenen Systems zu einem späteren Zeitpunkt in der Evolutionsgeschichte möglich.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings nur eine Möglichkeit des Transports von Glucosiden aus dem Darm in die Reservoirs. Es besteht auch die Möglichkeit, dass O-Glucoside im Darm gespalten werden und die Aglycone erst beim Durchtritt durch die Membranen wieder glucosidiert werden.

3.5 Suche nach glucosidisch gebundenen Komponenten in Blättern

Die Ergebnisse im vorherigen Kapitel haben einige neue Fragen aufgeworfen. Da *P. cochleariae* und *G. viridula* offensichtlich in der Lage sind, in großen Mengen Glucoside aus ihrem Fraß zu sequestrieren, wurde untersucht, ob sich in den Blättern ihrer Wirtspflanzen die entsprechenden glucosidischen Vorstufen finden lassen.

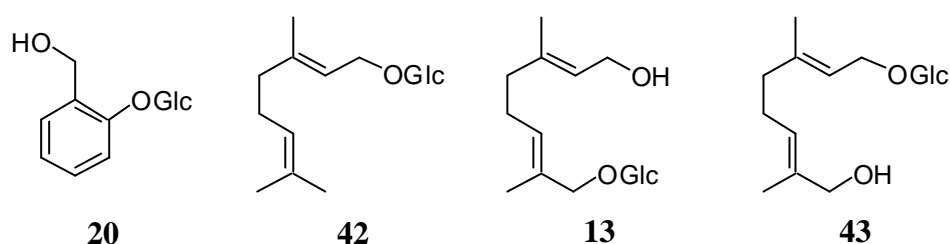


Abb. 34: Glucoside, die in Blattextrakten vermutet werden

Bislang ist bekannt, dass Salicin **20** in *Salix* und *Populus* Spezies vorkommt^[35,36,63,64]. Auch **13**, **42** und **43** sind bekannt aus Rosen, Trauben und Ingwer^[65-67].

Deshalb wurden Blätter (jeweils 2 bis 3 g) der verschiedenen Fraßpflanzen - nämlich Weide, Pappel, Sellerie, Chinakohl und Ampfer - auf das Vorhandensein dieser Glucoside untersucht. Die Blätter wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, zu einem feinen Pulver gemörsert und dann 1h lang extrahiert. Dazu wurde Methanol verwendet, um Glucosidasen, die eventuell in den Blättern enthalten sind, zu inaktivieren^[39]. Anschließend wurde der Extrakt zur Trockne eingedampft und mit Diethylether gewaschen, um alle lipophilen Bestandteile abzutrennen. Der zurückbleibende Feststoff wurde in 2 ml eines 1:1 Methanol-Wasser-Gemisches aufgenommen und per LC-MS wurden jeweils 20 µl der Lösung analysiert.

Da es bei der Ionisierung mit der APCI-Quelle wesentlich ist, dass die Einstellungen genau auf den Analyten abgestimmt sind, wurden unterschiedliche Tuneprogramme mit speziellen Gasflüssen und Temperaturen für die Glucoside Salicin **20** und 8-Hydroxygeraniol-1'-O-Glucosid **43** erstellt. Da diese

Tuneprogramme sehr speziell sind, wurde noch ein weiteres aufgesetzt, das ganz allgemein zur Detektion von Glucosiden dienen sollte. Als Standard dafür wurde das Disaccharid Cellobiose verwendet, das aus zwei 1,4-verknüpften Glucosen besteht, so dass die Fragmentierung ganz allgemein den Zerfall von glycosidisch gebundener Glucose wiedergibt. Die Proben wurden jeweils mit allen drei Programmen vermessen.

Die so erreichte Nachweisgrenze für die Glucoside beträgt etwa $5 \text{ ng}_{(\text{Glucosid})}/\text{g}_{(\text{Blatt})}$.

Wie erwartet, wurde in *Salix*- und *Populus*-Blättern Salicin **20** gefunden. Geranylglucoside konnten allerdings in keiner Probe nachgewiesen werden (Tabelle 7).

Pflanze	gefundenes Glucosid
Weide (<i>Salix alba Tristis</i>)	Salicin
Pappel (<i>Populus nigra</i>)	Salicin
Sellerie (<i>Armoracia rusticana</i>)	--
Chinakohl (<i>Brassica chinensis</i>)	--
wildwachsender Ampfer (<i>Rumex obtusifolia</i>)	--
gezüchteter Ampfer (<i>Rumex acetosa</i>)	--

Tabelle 7: Blätter, die auf Glucoside untersucht wurden

Der in Blütenblättern von Rosen gefundene Gehalt an **43** beträgt etwa $0,5 \text{ ng/g}_{(\text{Blatt})}^{[66]}$. Es ist also möglich, dass **13**, **42** oder **43** zwar enthalten sind, ihre Konzentrationen aber unter der Nachweisgrenze liegen. Da die Blätter alle erst im Herbst gesammelt wurden, waren nicht mehr genügend verfügbar, um eine intensivere Analytik durchzuführen. Deshalb sollte dieser Versuch im Frühjahr mit jungen Blättern wiederholt werden.

3.6 *In vitro* Umsetzung von Plagiodial

Iridoide finden sich nicht nur in der Wehrchemie von Chrysomeliden sondern auch bei karnivoren Käfern, z. B. bei *Philonthus* und *Ontholestes* Spezies^[68-70]. Es konnte gezeigt werden, dass die Iridoid-Biosynthese auch bei letzteren *de novo* passiert. Dabei zeigen sie bei der Oxidation von 8-Hydroxygeraniol **14** zu 8-Oxocitral **15** die gleiche Stereochemie wie *P. cochleariae*. Die Abstraktion des Wasserstoffatoms in Position 1 und 8 erfolgt von der *Re*-Seite. Dagegen findet sich ein

Unterschied bei der Cyclisierung von 8-Oxocitral **15** zu Plagiodial **2**. Während bei allen Herbivoren eine Abstraktion des H₅ in Position 4 gefunden wurde, konnten Experimente mit deuterierten Vorstufen zeigen, dass bei den Karnivoren das H₈ abstrahiert wird^[48,44]. Es zeigen sich also einige stereochemische Unterschiede, die weiter untersucht werden müssen.

Die Biosynthese von Chrysomelidial **1** läuft über die Isomerisierung von Plagiodial **2** (Abb. 35), deren stereochemischer Verlauf bislang nicht näher untersucht wurde.

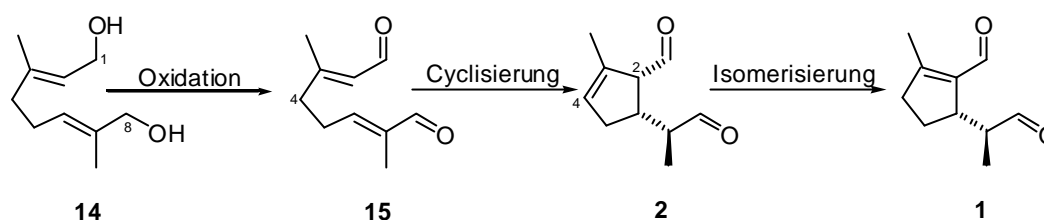


Abb. 35: Umsetzung von 8-Hydroxygeraniol **14** zu Chrysomelidial **1** in *P. cochleariae*

Betrachtet man die Isomerisierung von einem mechanistischen Standpunkt aus (Abb. 36), so wird in Position 2 ein Proton abstrahiert, während die Doppelbindung umlagert und in Position 4 ein weiteres Proton anlagert. Von welcher Seite dieser Angriff erfolgt, ist nicht bekannt.

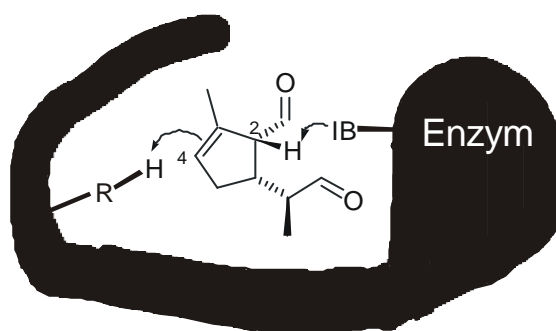


Abb. 36: Mechanistische Überlegung zu der Isomerisierung von Plagiodial **2** zu Chrysomelidial **1** in *P. cochleariae*

Um dies zu untersuchen, muss man folgende Dinge beachten:

- Um detektieren zu können, von welcher Seite der Angriff erfolgt, muss entweder bereits im Plagiodial **2** in Position 4 ein Deuteriumatom vorhanden sein, oder es muss in einem deuteriertem Lösemittel gearbeitet werden, so dass ein D-Atom eingebaut wird.
⇒ Alle Umsetzungen erfolgten in deuterierten Lösemitteln.
- Im verwendeten Wehrsekret ist eine große Menge Chrysomelidial **1** enthalten, das zuerst von den Proteinen abgetrennt werden muss, da der Einbau sonst nicht beobachtet werden kann.

⇒ Das Sekret wird in D₂O aufgenommen und die Proteine per (NH₄)₂SO₄-Fällung abgetrennt. Anschließend werden sie wieder in einem deuterierten Puffer aufgenommen.

Zu der so vorbereiteten Enzym-Lösung wurde Plagiodial **2** gegeben. Der Verlauf der Umsetzung wurde per GC-MS verfolgt. Es konnte allerdings keine Bildung von Chrysomelidial **1** beobachtet werden.

Um zu testen, ob sich überhaupt mit diesem Verfahren eine Umsetzung erreichen lässt, wurde erneut Sekret von 20 Larven abgenommen und aufgearbeitet. Diesmal wurde es allerdings mit 8-Hydroxygeraniol **14** umgesetzt. Es wurde in diesem Fall eine Oxidation zu 8-Oxogeraniol **15** beobachtet (Abb. 37).

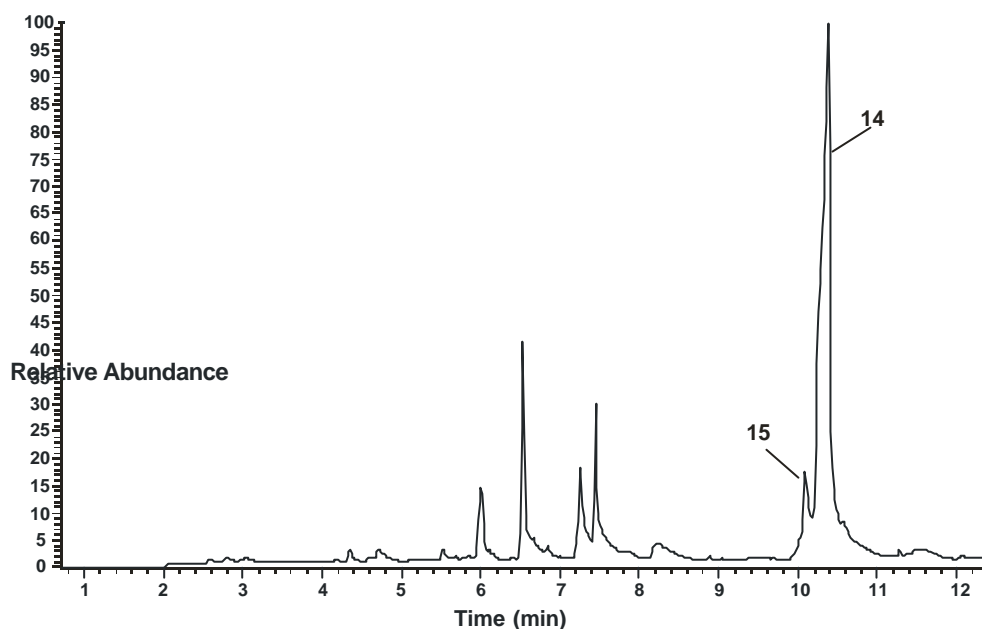


Abb. 37: Oxidation von **14** zu **15** durch Sekretextrakt von *P. cochleariae* nach 44 h Umsetzung

Zwei mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis sind: Zum einen kann die Isomerase oder ein wichtiger Cofaktor bei der (NH₄)₂SO₄-Fällung verloren gegangen sein. Zum anderen ist es möglich, dass unter den verwendeten Reaktionsbedingungen zwar die Oxidase, aber nicht die Isomerase arbeiten kann.

Das lässt sich verstehen, wenn man das Sekret der Blattkäferlarven genauer betrachtet. Es besteht aus einem Zweiphasensystem, was bereits bei seiner Abnahme gut zu beobachten ist. Das bedeutet, dass die Oxidation von **14** zu **15** z. B. in der wässrigen Phase und die Isomerisierung von **15** zu **2** in der lipophilen Phase stattfinden könnte. Da 8-Oxogeraniol **15** sehr lipophil ist, ist anzunehmen,

dass es nach der Oxidation zu einem Phasenwechsel des Substrats in die lipophile Phase kommt. Dort könnten dann die weiteren Umsetzungen stattfinden. Das würde erklären, warum es in einer rein wässrigen Phase zu keiner beobachtbaren Cyclisierung oder Isomerisierung kommen kann. Für weitere Experimente ist deshalb darauf zu achten, dass eine lipophile Komponente oder ein Detergenz zugegeben wird.

3.7 Untersuchung auf schwerflüchtige Substanzen im Wehrsekret

Die meisten chemischen Analysen des Wehrsekrets wurden mit GC-MS durchgeführt. Wie schon aus Untersuchungen anderer Wehrsekrete bekannt ist, enthalten diese meistens aber auch noch Substanzen wie Zucker und Fettsäuren, die ohne eine entsprechende Derivatisierung zu schwerflüchtig sind, um im GC-MS gefunden zu werden. Um herauszufinden, ob es auch im Wehrsekret von *P. cochleariae* noch weitere unbekannte Substanzen gibt, wurde Sekret gesammelt, silyliert und per GC-MS untersucht.

Zuerst musste aber ein geeignetes Silylierungsmittel gefunden werden.

3.7.1 Silylierungsmittel

Als Silylierungsmittel wurde N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (MSTFA) **45** gewählt. Es handelt sich dabei um ein starkes Silylierungsmittel, das mit fast allen Verbindungen, die ein aktives Wasserstoffatom besitzen, nach Abb. 38 reagiert.

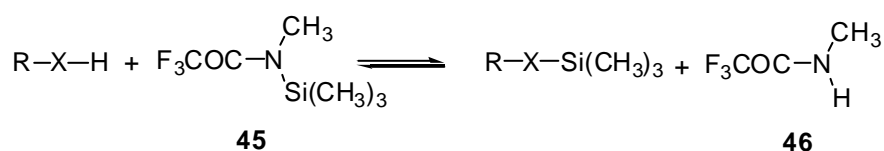


Abb. 38: Allgemeines Reaktionsschema für die Silylierung mit MSTFA

Außerdem bietet dieses Reagenz den Vorteil, dass es selbst und auch das entstehende N-Methyltrifluoroacetamid **46** sehr leicht flüchtig sind. Dadurch haben sie eine sehr kurze Retentionszeit auf dem GC und lassen sich gut von den anderen Analyten abtrennen.

Durch die Zugabe von polaren Lösungsmitteln wie Pyridin oder TFA können die Lösungseigenschaften der Analyten noch erhöht werden.

Es wurden daher zwei verschiedene Methoden zur Silylierung getestet:

1. 0,25 ml (MeCN/Py) 4/1 mit 0,2 ml MSTFA mit Sekret von 10 Larven
2. 0,1 ml TFA mit 0,9 ml MSTFA mit Sekret von 10 Larven

Die Chromatogramme mit Mischung 1 zeigten einen deutlich höheren Silylierungsgrad.

Für das Sekret von *P. cochleariae* erhält man folgendes Chromatogramm:

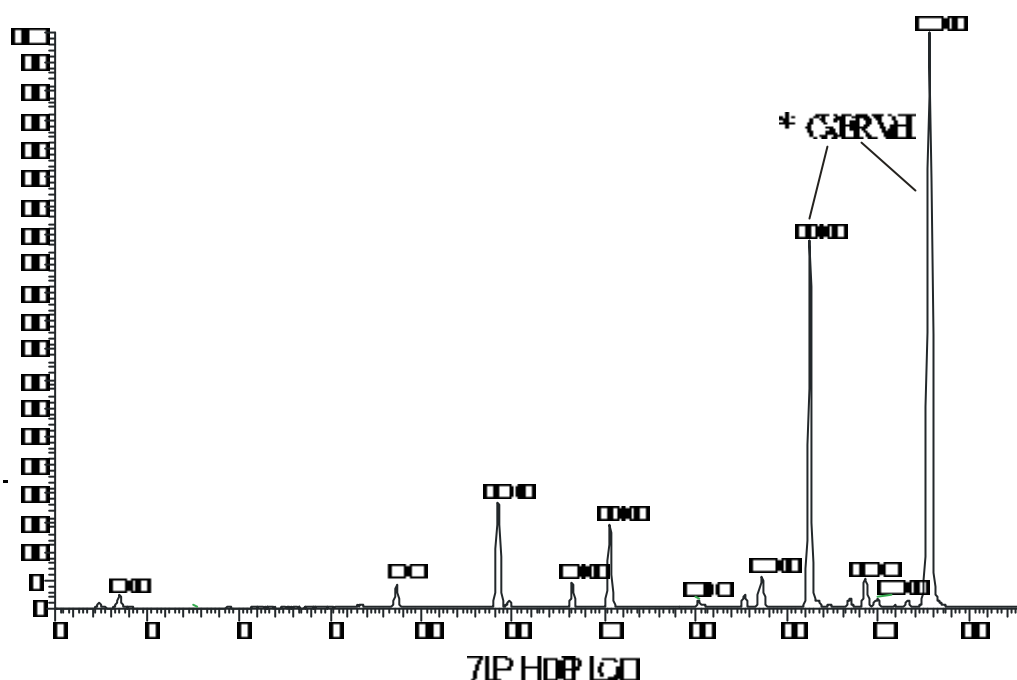


Abb. 39: GC-Chromatogramm von silyliertem Sekret von *P. cochleariae*

Die Analyse erfolgte auf einem GC, das mit einem Quadrupol-MS gekoppelt war.

3.7.2 Untersuchung auf Zucker

Abb. 39 zeigt, dass sich in dem Wehrsekret der Blattkäferlarven Glucose befindet, wie bereits früher schon gezeigt werden konnte. Es war nun interessant, herauszufinden, ob sich in dem Sekret auch andere Zucker finden lassen. Darum wurde eine silylierte Sekretprobe mit verschiedenen silylierten Standardzuckern verglichen. Es ließ sich allerdings keiner der getesteten Zucker (außer Glucose) nachweisen.

Es wurden getestet:

Pentosen:	D-(+)-Xylose
(C ₅ H ₁₀ O ₅)	L-(+)-Arabinose

Hexosen:	D-(+)-Mannose
(C ₆ H ₁₂ O ₆)	D-(-)-Fructose
	D-(+)-Glucose
	D-(+)-Galactose
(C ₆ H ₁₀ O ₆)	Gluconolacton

Disaccharide	Maltose
(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	D-(+)-Sucrose
	α-Lactose
	D-(+)-Cellobiose

3.8 Untersuchungen von Polymeren im Wehrsekret

Eine besondere Eigenschaft des Wehrsekrets besteht darin, dass es sehr schnell polymerisiert. Um herauszufinden, wie dieses Polymer aufgebaut ist, sollten zuerst mit Hilfe von MALDI-MS (Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry) einige Voruntersuchungen durchgeführt werden.

Bei dieser Ionisierungstechnik wird der Analyt mit einer Matrix auf einem Probenhalter kokristallisiert und mit einem gepulsten UV-Laser bestrahlt. Die Matrix adsorbiert die Energie und überträgt sie auf den Analyten, der so ionisiert wird. Diese Ionisierungstechnik ist besonders geeignet, um große Moleküle mit einer Masse von bis zu 300000 Da und mehr, wie z. B. Proteine, zu ionisieren und ihr Molgewicht zu bestimmen, da es kaum zu Fragmentierungen kommt^[71].

Dafür wurde Sekret entnommen und an der Luft getrocknet, bis ein bräunlich

harziger Feststoff entstanden war. Versuche, diesen Feststoff in gängigen, organischen Lösemitteln oder auch in wässriger NH_3 oder HCl aufzunehmen, sind allerdings gescheitert. Um dennoch eine gute Mischung mit den Matrices, die für die MALDI-Messungen verwendet werden, zu erzielen, wurde versucht, einen "Sandwich" zu bauen (Abb. 40).

Dafür wurde zuerst eine Lösung der Matrix auf das MALDI-Target aufgetragen und getrocknet. Dann wurde Sekret von etwa zehn Larven gesammelt und aufgetragen. Nachdem das Sekret genügend Zeit hatte, um an der Luft zu polymerisieren, wurde darüber eine weitere Schicht der Matrix aufgetragen.

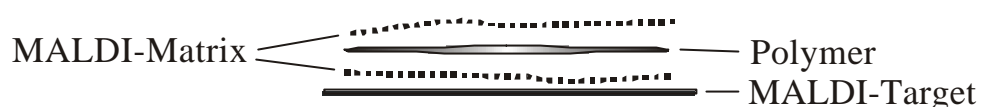


Abb. 40: Darstellung der Sandwich-Anordnung für die MALDI-Messung

In Tabelle 8 sind die fünf verschiedenen Matrices, die verwendet wurden, um eine Ionisierung herbeizuführen, mit ihrem Verwendungszweck aufgeführt.

Matrix	Strukturformel	Analyte
3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure)		Proteine, Peptide, Polymere
α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (α -Cyano)		Peptide, Polymere
2,5-Dihydroxy-benzoesäure (DHB)		Zucker, Peptide, Nukleotide, Polymere
Dithranol		Polymere
Dithranol + $\text{Ag}(\text{CF}_3\text{CO}_2)$		Polymere

Tabelle 8: Verwendete Matrices zur Ionisierung des Polymers via MALDI^[72]

Leider konnte keine Ionisierung erreicht werden. Dafür kann es mehrere Gründe geben:

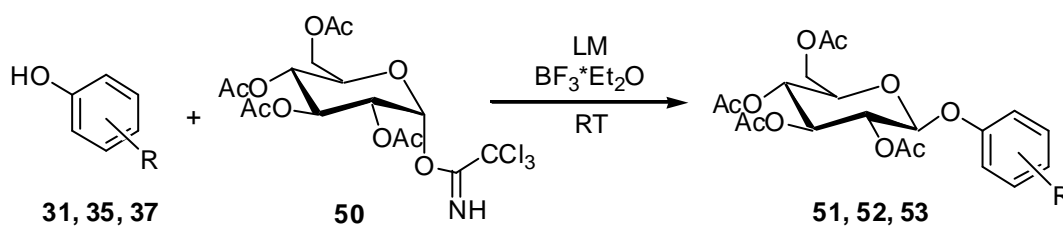
1. Die verwendeten Matrices waren nicht geeignet, das vorliegende Polymer zu ionisieren.
2. Durch die verwendete Sandwichtechnik konnte es zu keiner Wechselwirkung zwischen Matrix und Polymer kommen.

3.9 Synthesen

3.9.1 Darstellung der phenolischen Glucoside

Die phenolischen Glucoside **30**, **32** und **34** wurden nach einer Methode von Schmidt dargestellt^[73]. Unter katalytischer Wirkung von $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ wurden die Phenole **31**, **35** und **37** mit 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-*O*- α -D-glucopyranosyltrichloracetimidat **50** gekoppelt. Aufgrund der Nachbargruppenbeteiligung der 2-*O*-Acetylgruppe entsteht ausschließlich das β -Glucosid.

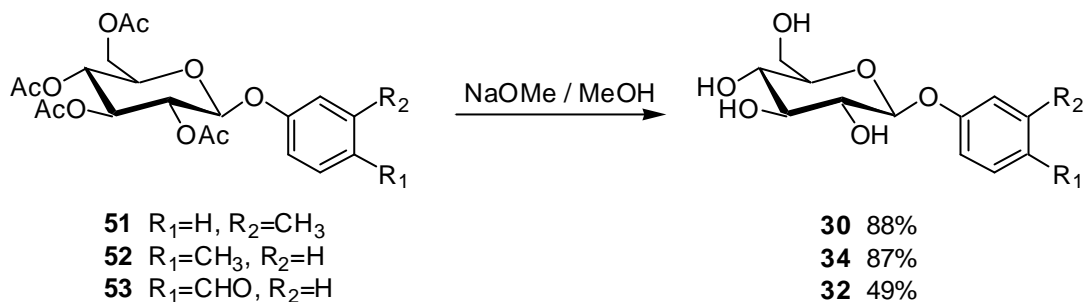
Als Lösemittel für die Kresole **31** und **37** wurde Dichlormethan verwendet. Da sich der Aldehyd **35** darin aber nicht zufriedenstellend löste, wurde für ihn Chloroform benutzt.



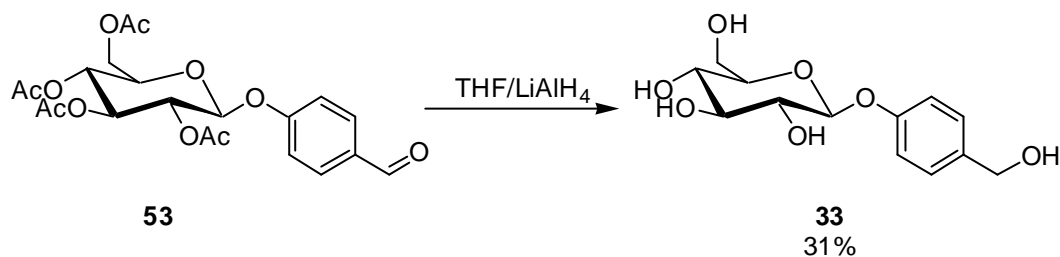
	$\text{R}_1 = \text{H}$ $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ 31	$\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{H}$ 37	$\text{R}_1 = \text{CHO}$ $\text{R}_2 = \text{H}$ 35
LM	CH_2Cl_2	CH_2Cl_2	CHCl_3
Ausbeute (nach Säulenchromatographie)	59 %	42 %	53 %

Tabelle 9: Ausbeuten und Reaktionsbedingungen bei der Glucosidierung der Phenole **31**, **35** und **37**

Die Schutzgruppen wurden direkt von dem entstandenen Rohprodukt mit Natriummethanolat in Methanol abgespalten.



Um auch das Glucosid **33** zu erhalten, wurde das peracetylierte Glucosid **53** mit LiAlH_4 reduziert.

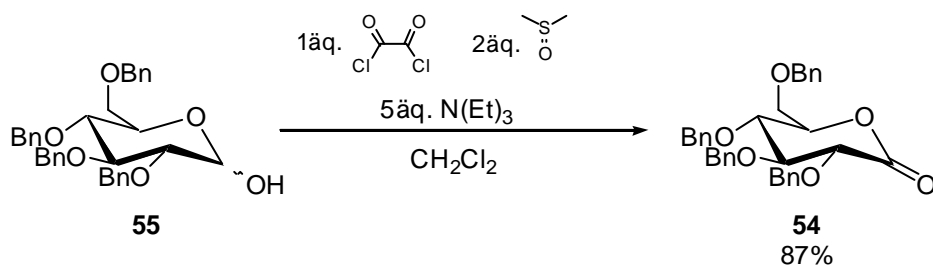


3.9.2 Stabile Analoga der natürlich vorkommenden Glucoside

C-Glucosid von Salicin 20

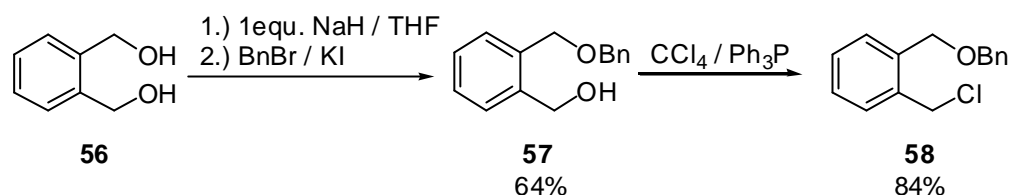
Auf der Suche nach einem stabilen Analogon von Salicin **20** wurde auch versucht, das *C*-Glucosid zu synthetisieren.

Dafür wurde zunächst 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-gluconolacton **54** durch eine Swern-Oxidation aus 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-glucose **55** dargestellt^[74].



Dann wurde (2-Hydroxymethyl-phenyl)-methanol **56** zu **57** monobenzyliert. Dies

gelang in guten Ausbeuten unter Deprotonierung mit einem Äquivalent NaH und anschließender Umsetzung mit Benzylchlorid und einem katalytischen Anteil von KI. Die darauffolgende Halogenierung der zweiten Hydroxy-Gruppe zu dem bislang unbekannten **58** erfolgte über die Umsetzung mit Triphenylphosphan und Tetrachlorkohlenstoff in Acetonitril^[75].

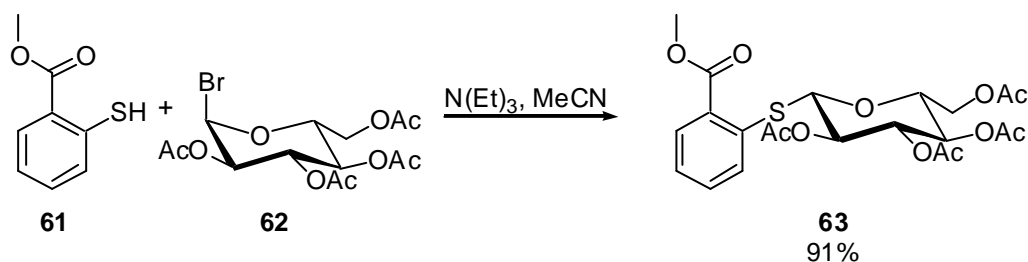


Anschließend sollte **58** mit Grignardreaktion an Tetrabenzyl-Gluconolacton gekuppelt werden. Dabei wurde allerdings keine Kupplung beobachtet.

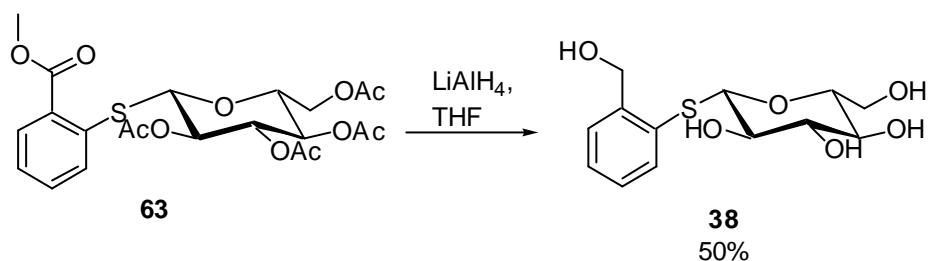
Bevor genauere Untersuchungen über den Verlauf der Reaktion durchgeführt werden konnten, gelang allerdings die Fertigstellung des *S*-Glucosid-Analogons, so dass diese Synthese nicht weiter verfolgt wurde.

Thiosalicin **38**

Für die Darstellung des bislang nicht beschriebenen Thioanalogons von Salicin **20**, wurde eine Vorschrift von Tsvetkov *et al.* für die Synthese aromatischer Thioglycoside verwendet^[76]. Es handelt sich dabei um eine Königs-Knorr-Synthese, bei der 2-Mercaptobenzoessäure **61** und 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-brom-glucose **62** mit Hilfe von Triethylamin in Acetonitril gekuppelt werden. Die Reaktion verläuft über einen $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus. Nach der Abspaltung des Broms bildet sich mit der benachbarten Acetylgruppe ein Acyloxonium-Ion, wodurch die α -Seite abgeschirmt wird. So kann nur das β -Produkt entstehen^[77].



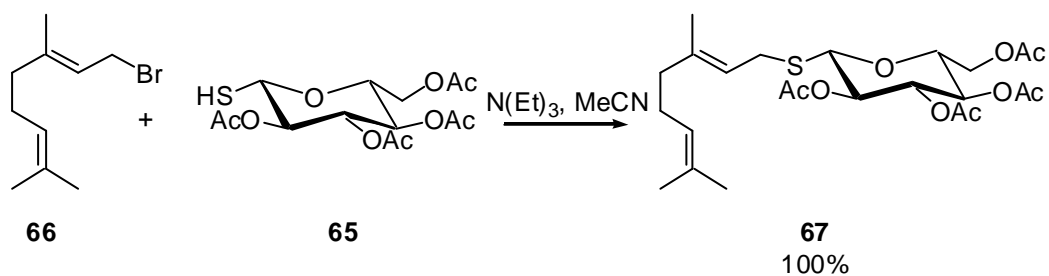
Anschließend erfolgte Reduktion mit LiAlH_4 .



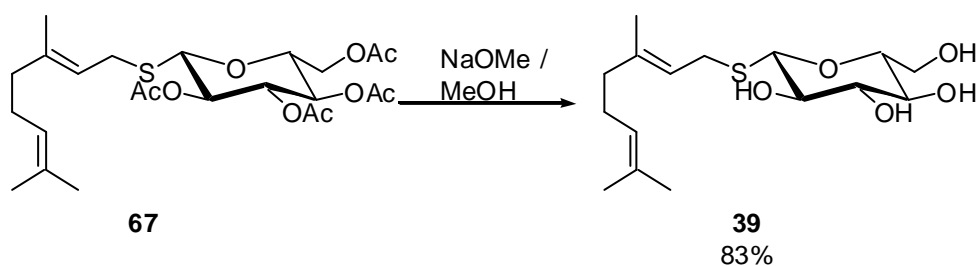
Geranyl-1-thio- β -D-glucosid 39

Um das bisher nicht synthetisierte Thioglucosid von Geraniol darzustellen, sollte nach dem gleichen Syntheschema vorgegangen werden wie zur Synthese von Thiosalicin **38**. Thiogeraniol konnte von einer Firma für Aromastoffe (GRAU AROMATICS) erhalten werden. Eine gaschromatographische Untersuchung ergab jedoch, dass es sich dabei um ein Gemisch von 5 verschiedenen Komponenten handelte, so dass ohne eine intensive Aufreinigung keine Synthese möglich war. Um der daraus resultierenden Geruchsbelästigung zu entgehen, wurde deshalb versucht, eine andere Möglichkeit zur Kupplung zu finden.

Aus diesem Grund wurden 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- β -D-glucose **65** als Nukleophil und Bromgeraniol **66** als Elektrophil verwendet. Die Kupplung erfolgte unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der Bildung von **63**. Die Reaktion verlief quantitativ und das erhaltene Rohprodukt **67** war NMR-rein.



Ohne weitere Aufreinigungsschritte wurden die Schutzgruppen mit NaOMe in Methanol abgespalten.

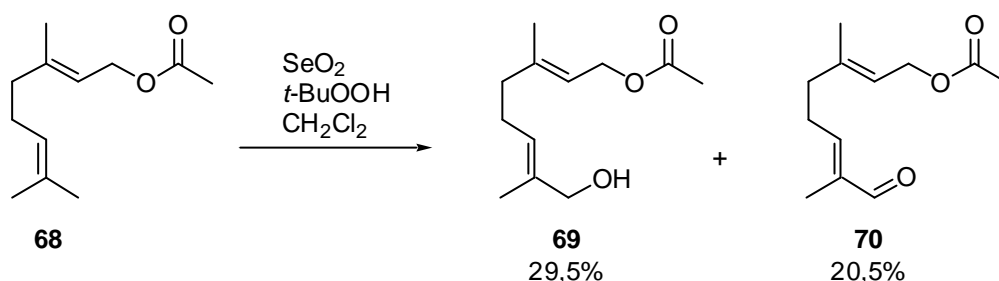


8-Mercapto-3,7-dimethyl-octa-2,6-dien-1-ol-1'-thio-**b**-D-glucosid **40** und

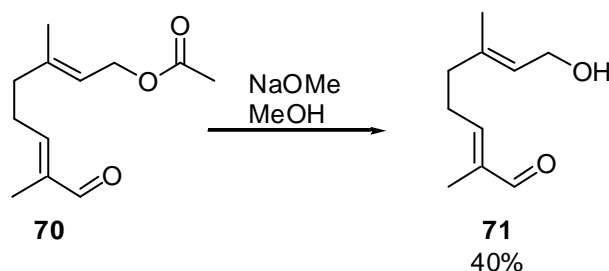
8-Mercapto-2,6-dimethyl-octa-2,6-dien-1-ol-1'-thio-**b**-D-glucosid **41**

Auch für die Synthese der beiden Monothioglucoside von 8-Hydroxygeraniol **40** und **41** stand keine Literaturvorschrift zur Verfügung. Da es synthetisch sehr aufwändig wäre, die entsprechenden Geranyl bromide oder -thiole herzustellen, wurde für ihre Darstellung ein anderer Syntheseweg eingeschlagen.

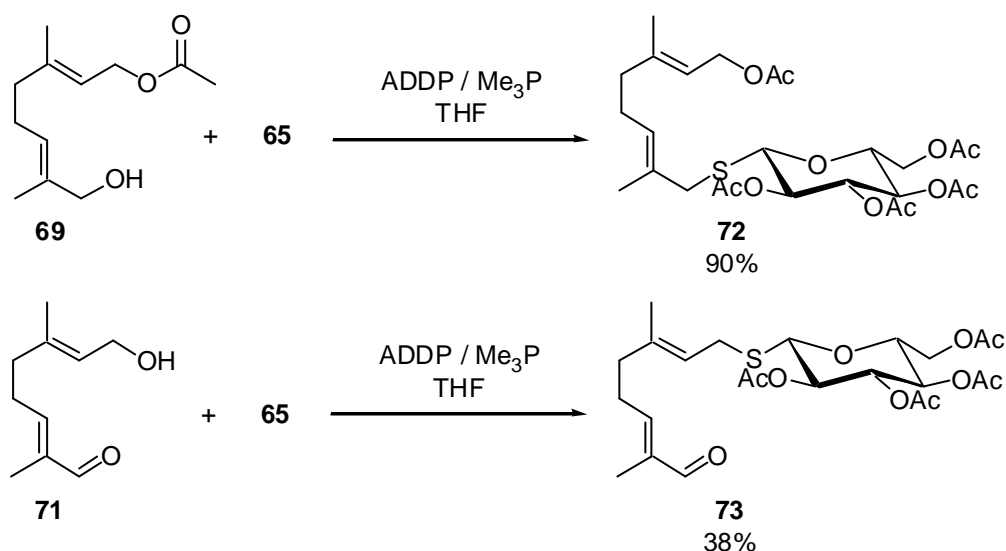
Geranylacetat **68** wurde mit SeO_2 und *t*-Butylhydroperoxid oxidiert. Dabei entstanden im Verhältnis 3:2 der Alkohol **69** und der Aldehyd **70**, die sich einfach säulenchromatographisch trennen ließen^[78].



Um 8-Oxogeraniol **71** zu erhalten, wurde die Acetylschutzgruppe von **70** mit NaOMe in Methanol abgespalten.

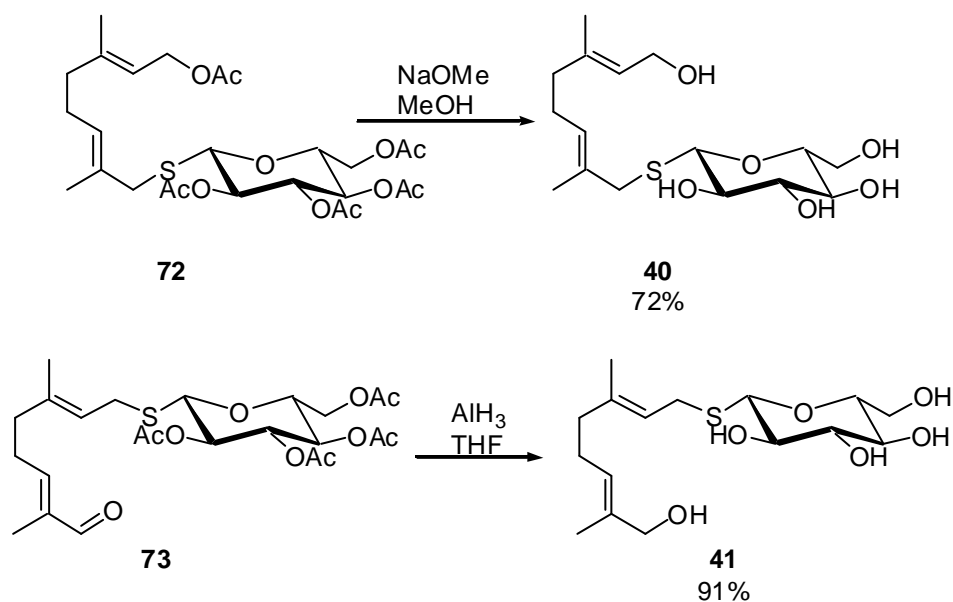


Die beiden Alkohole **69** und **71** wurden mit Hilfe einer auf Thioglucoside abgestimmten Variante der Mitsunobu-Reaktion synthetisiert^[79]. Dafür wurde zuerst unter Eiskühlung ein Addukt aus 1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin (ADDP) mit Trimethylphosphan gebildet, das dann die Kupplung zwischen Alkohol und Thioglucose bewirkt.



Es fällt auf, dass der Aldehyd **71** nur eine sehr schlechte Umsetzung unter den Mitsunobu-Bedingungen zeigt. Das ist möglicherweise auf die Labilität des Michaelakzeptorsystems zurückzuführen.

Anschließend wurden die Acetylschutzgruppen im Falle von **72** mit NaOMe in Methanol abgespalten. Um die Aldehydgruppe in **73** zu reduzieren, wurde AlH₃ verwandt, wodurch auch gleichzeitig die Acetylgruppen am Glucose-Rest entfernt wurden.



4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Mit dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass in Blattkäferlarven ein System zum Transport von glucosidisch gebundenen Vorstufen ihrer Wehrsubstanzen aus dem Darm in die Wehrdrüsen/Reservoir existiert. Dadurch können neue Einblicke in die Evolution der Wehrsysteme von Larven der Chrysomelidenunterfamilie Chrysomelinae gewonnen werden.

Fütterungsversuche mit den phenolischen Glucosiden **20**, **22**, **25**, **26**, **32** und **33** (Abb. 41) zeigen, dass eine *ortho*-Substitution am Aromaten ein wichtiges Kriterium für den Transport in *P. cochleariae* und *G. viridula* Larven ist.

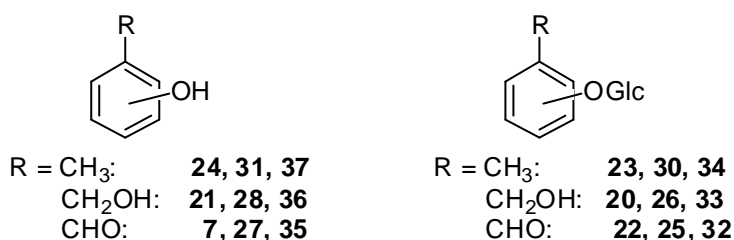


Abb. 41: Phenole und phenolische Glucoside

Auch bei der Fütterung der Aglycone **7**, **21**, **37**, **28**, **35** und **36** wird die gleiche Selektivität beobachtet. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie beim Durchtritt durch die Membran glucosidiert werden.

Die Kresole **24**, **31** und **37** und die Kresolglucoside **23**, **30** und **34** werden dagegen in deutlich größerer Menge im Sekret gefunden. Wahrscheinlich gelangen sie durch Diffusion der Aglycone in die Reservoir.

Zur genauen Klärung dieser Sachverhalte sind allerdings weitere Experimente nötig.

Um die Transportmechanismen in den Larven zu untersuchen, wurden Thioglucoside verwendet, da sie stabil gegen Glucosidasen sind und gleichzeitig genügend Ähnlichkeit mit den entsprechenden *O*-Glucosiden aufweisen, um von einem Transportsystem akzeptiert zu werden. Die untersuchten Thioglucoside **38** bis **41** sind synthetisch leicht über Königs-Knorr- oder Mitsunobu-Reaktionen zugänglich (Abb. 42).

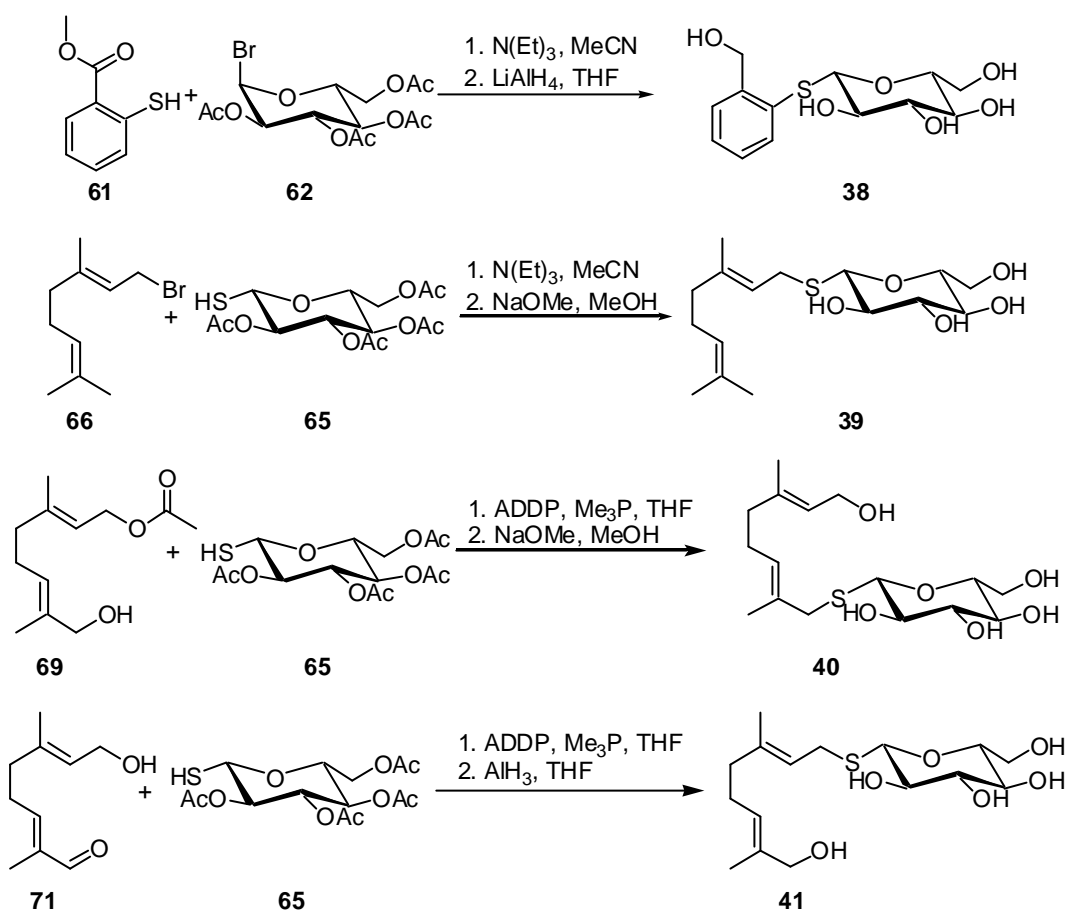


Abb. 42: Synthese der untersuchten Thioglucoside **38** bis **41**

Der Nachweis der Thioglucoside in Wehrsekret und Hämolymphe der Larven ist mit LC-MS möglich. Dafür wird eine Säule mit kleinen Ausmaßen, die mit reversed Phase-Material bestückt ist, verwendet. Die Detektion und Quantifizierung gelingt im UV bei den Wellenlängen 254 nm (**38**) und 224 nm (**39**, **40**, **41**). Mit Hilfe der MS-Kopplung lassen sich die Thioglucoside in der Probenmatrix zweifelsfrei identifizieren.

Die starke strukturelle Ähnlichkeit zwischen Salicin **20** und Thiosalicin **38** konnte durch einen Vergleich der Kristallstrukturen gezeigt werden.

Die Applikation der Thioglucoside **38**, **39** und **40** über den Fraß wirkt sich im untersuchten Zeitraum von maximal 48 h nicht nachteilig auf die Entwicklung von *P. cochleariae* Larven aus.

Bei der Fütterung von *C. populi*, *P. vitellinae*, *P. laticolis*, *P. cochleariae* und *G. viridula* Larven mit **38** bis **41** zeigte sich, dass keine dieser Spezies in der Lage war, **39** zu sequestrieren. Die zusätzliche OH-Gruppe am Aglycon ist für den Transport also von großer Bedeutung.

Dagegen konnten sowohl bei den *de novo* Produzenten als auch bei den Sequestrierern die übrigen drei Thioglucoside in Sekret und Hämolymphe nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme dabei bildet *P. laticolis*. Diese Spezies lebt zwar auf *Salix*, produziert aber keinerlei Salicylaldehyd **7**. Wie erwartet, war sie auch nicht in der Lage, **38** zu sequestrieren.

Kinetische Untersuchungen, bei denen die Menge der Thioglucoside in Sekret und Hämolymphe zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert wurden, geben Aufschluss über die Substratspezifität des Transporters in *de novo* Produzenten und Sequestrierern. Abb. 43 zeigt die 12 h-Messwerte, die im Sekret nach der Fütterung von *C. populi*, *P. cochleariae* und *G. viridula* mit den Thioglucosiden **38**, **40** und **41** gefunden wurden.

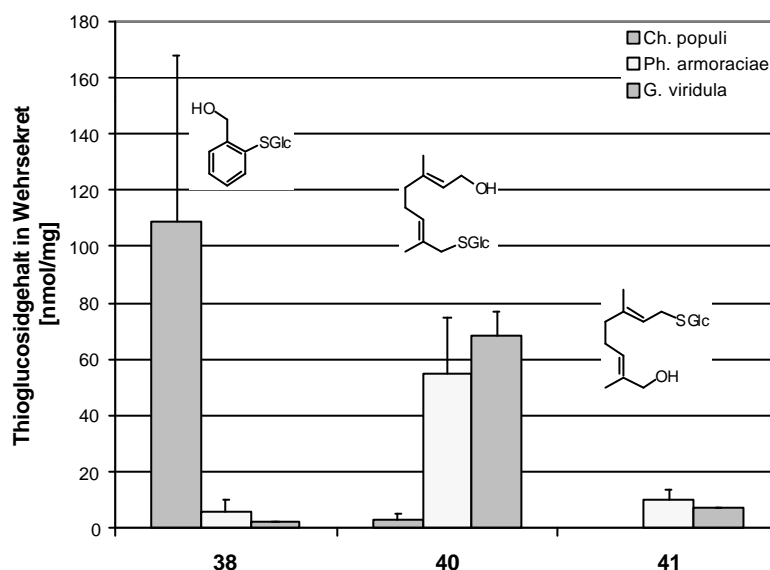


Abb. 43: Zusammenfassung der 12 h-Sekret-Messwerte der Fütterungen mit den Thioglucosiden **38**, **40** und **41**

Man sieht deutlich, dass das Transportsystem des Sequestrierers *C. populi* eine deutliche Bevorzugung für das aromatische Thioglucosid **38**, dem Analogon seines natürlichen Substrates, zeigt. Trotzdem können auch die beiden Monothioglucoside von 8-Hydroxygeraniol **40** und **41** in geringem Maß sequestriert werden.

Aber auch die *de novo* Produzenten *P. cochleariae* und *G. viridula* sind in der Lage zu sequestrieren. Sie bevorzugen das Thioanalogon des auch schon im Wehrsekret nachgewiesenen 8-Hydroxygeraniol-glucosids **13** gegenüber den anderen getesteten Thioglucosiden **39** und **41**. Das führt zu der Vermutung, dass

sie nicht, wie bislang angenommen, reine *de novo* Produzenten sind, sondern einen Teil ihrer Wehrsubstanzen durch Sequestrierung herstellen. Dieser Mechanismus könnte aus einer älteren Evolutionsstufe der Blattkäferlarven hervorgegangen sein, bei der die Iridoide ausschließlich durch Sequestrierung von Geranylglucosiden produziert wurden.

Die Hämolymphe dient nur als Transportmedium für die Thioglucoside. Es kommt dort zu keiner Anreicherung.

Aus diesen neuen Erkenntnissen und dem von Termonia *et al.* erstellten Cladogramm zur Entwicklung der Wehrchemie in Chrysomelinae-Larven in Abb. 8^[38], lässt sich nun das in Abb. 44 gezeigte Schema erstellen. Die in dieser Arbeit untersuchten Spezies sind durch den großen Rahmen hervorgehoben. In dem kleinen Rahmen ist noch einmal der enzymatische Apparat aufgeführt, der bereits in den *de novo* Produzenten vorhanden ist und den evolutiven Wechsel zum Sequestrieren von Salicin 20 ermöglicht.

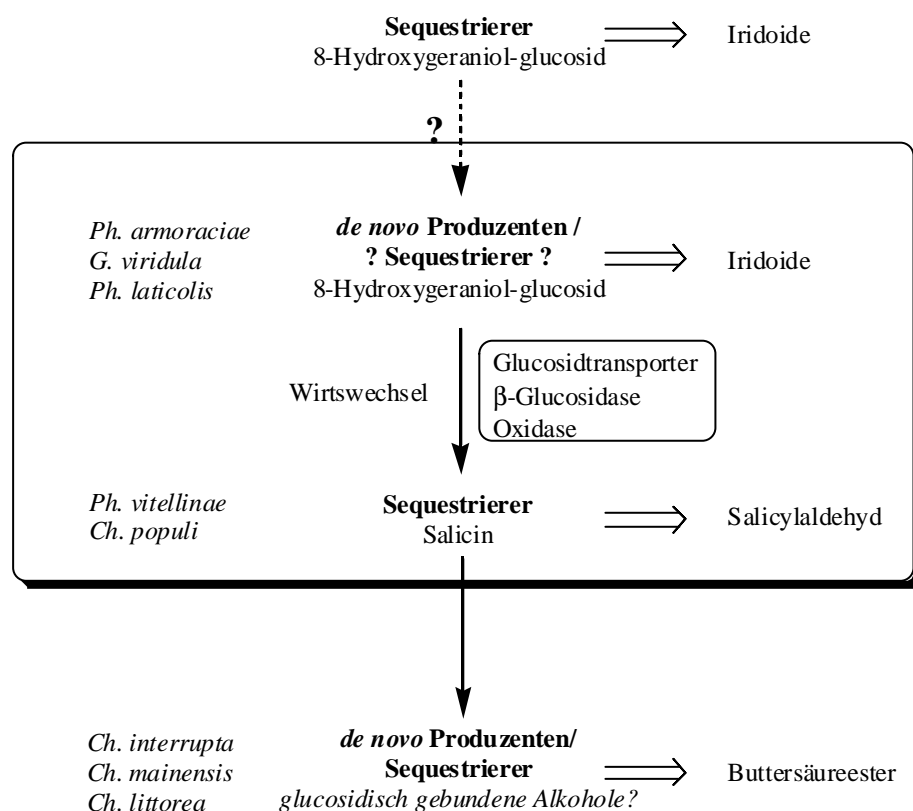


Abb. 44: Schematische Darstellung der Entwicklungsstufen der Wehrchemie von Chrysomelinae-Larven (: produzierte Wehrsubstanzen, : hypothetische Weiterentwicklung, : Weiterentwicklung)

Weiterhin bleibt die Frage offen, ob die Larven der letzten, dargestellten

Entwicklungsstufe die sequestrierten Alkohole ebenfalls in glucosidisch gebundener Form aufnehmen. Aus diesem Grunde sind weitere Experimente mit den Thioglucosiden dieser Alkohole geplant. Außerdem können die schwer interpretierbaren Ergebnisse bei der Fütterung mit phenolischen Glucosiden unter Verwendung von Thioglucosiden wiederholt werden und so zu einer eindeutigeren Aussage führen.

Eine eingehendere Untersuchung der Fraßpflanzen auf den Gehalt von Geranylglucosiden könnte helfen herauszufinden, ob die sogenannten *de novo* Produzenten tatsächlich einen Teil ihrer Wehrsubstanzen aus sequestrierten Vorstufen herstellen.

Außerdem könnte die Herkunft der Iridoide mit Hilfe der Isotopenverhältnismassenspektrometrie untersucht werden. Während Insekten zur Terpenbiosynthese nur die Mevalonat-Route zur Verfügung steht, gibt es in Pflanzen auch noch den sogenannten MEP-Weg, über den vor allem Monoterpene, zu denen auch die Iridoide gehören, synthetisiert werden. Da an beiden Wegen unterschiedliche Enzyme mit verschiedenen kinetischen Isotopeneffekten beteiligt sind, lässt sich gegebenenfalls die Herkunft von Terpenen aus dem natürlichen C12/C13-Isotopenverhältniss ermitteln^[80]. Mit Hilfe dieser Technik könnte es also möglich sein, im Wehrsekret den Anteil der Iridoide, deren Vorstufen pflanzlichen Ursprungs sind, zu bestimmen.

Auch auf anderen Gebieten bietet die Wehrchemie der Blattkäferlarven noch viel Raum für interessante Forschung: Die Isolierung und Sequenzierung der Proteine, die an dem Glucosidtransport beteiligt sind, böte die Möglichkeit, eine Phylogenie der Transportsysteme zu erstellen.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Alle Reaktionen wurden in getrockneten Lösemitteln und unter Argon durchgeführt.

Nach dem Trocknen der Ansätze über MgSO_4 wurde durch Abdestillieren des Lösemittels bei vermindertem Druck aufkonzentriert.

Die Ausbeuten beziehen sich auf NMR-reine Substanzen, die entsprechend der Angaben aufgereinigt wurden.

Spektroskopie

NMR-Spektrometer	Bruker Avance DRX 500
IR-Spektrometer	Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer
HR-MS-Spektrometer	Micromass MassSpec
	Micromass Quattro II
MALDI-TOF-MS	Micromass ToFSpec 2E
UV-Spektrometer	Spectronic [®] 20 GENESYS [™]
Elementaranalyse	Elementar Vario EL
Kristallstruktur	Nonius KappaCCD Diffraktometer

Chromatographie

LC-MS	Agilent HP1100 mit Finnigan LCQ
LC-Säule	GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 3 μm , 125*2 mm
GC-MS	Finnigan MAT Magnum (Ionenfalle)
	ThermoQuest trace GC-MS 2000 (Quadrupol)
GC-Säulen	Alltech EC-5; Länge: 15m; ID: 0,25mm; Film: 0,25 μm

Säulenchromatographie	Merck, Kieselgel 60 (0,0963-0,200mm)
MPLC (Reversed Phase)	LiChroprep [®] RP-18 (40-63μm)
DC	Merck, PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂₄₅ , Schichtdicke 2 mm

optische Geräte

Stereomikroskop	Zeiss Stemi 2000-C
-----------------	--------------------

5.2 Verwendete Chemikalien

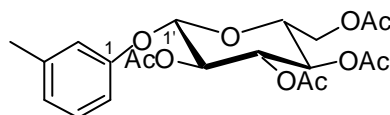
1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin (ADDP)	Fluka
2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1-β-D-thioglucopyranose	Sigma
2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-1-β-D-bromglucopyranose	Fluka
Bromgeraniol	Aldrich

5.3 Synthesevorschriften

*allgemeine Synthesevorschrift zur Kopplung von Phenolen mit 2,3,4,6- Tetra-*O*-acetyl-1-**a**-glucopyranosyl-trichloracetimidat 50*

2,3,4,6-*O*-Tetraacetyl-1-*O*-α-glucopyranosyl-trichloracetimidat **50** wird mit 3 Äquivalenten *m*- oder *p*-substituiertem Phenol in Lösemittel gelöst. Unter Eiskühlung wird eine katalytische Menge von BF₃·Et₂O zugegeben. Anschließend wird die Reaktion 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von K₂CO₃ und Lösemittel wird die organische Phase dreimal mit H₂O extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zweimal reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen zum Rohprodukt eingengt.

*3-Tolyloxy-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-**b**-D-glucopyranosid 51*

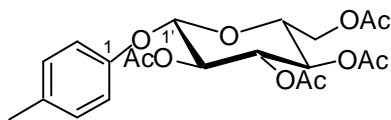


Ansatz: 452 mg (0,92 mmol) Trichloracetimidat **50**, 360 μl (3,3 mmol) *m*-Kresol **31**, 10 ml CH₂Cl₂, 100 μl (0,1 mmol) einer 0,5 M Lösung von BF₃·Et₂O in CH₂Cl₂, 50 mg (0,36 mmol) K₂CO₃. Reinigung erfolgt durch

Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/PE 1:2).

Ausbeute: 241 mg (0,55 mmol, 59 %)

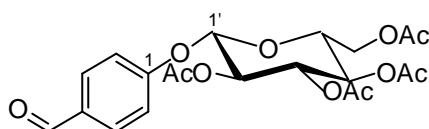
4-Tolyloxy-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'- β -D-glucopyranosid 52



Ansatz: 126 mg (0,25 mmol) Trichloracetimidat, 80 mg (0,75 mmol) p-Kresol **37**, 10 ml CH₂Cl₂, 100 μ l (0,1 mmol) einer 0,5 M Lösung von BF₃*Et₂O in CH₂Cl₂, 10 mg (0,07 mmol) K₂CO₃. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/PE 1:2).

Ausbeute: 138 mg (0,31 mmol, 42 %)

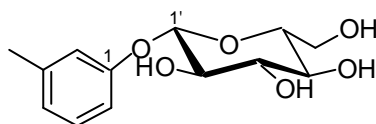
4-Formyl-phenoxy-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'- β -D-glucopyranosid 53



Ansatz: 874 mg (1,77 mmol) Trichloracetimidat **50**, 814 mg (6,67 mmol) p-Hydroxybenzaldehyd **35**, 20 ml CHCl₃, 200 μ l (0,2 mmol) einer 0,5 M Lösung von BF₃*Et₂O in CH₂Cl₂, 100 mg (0,72 mmol) K₂CO₃. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/PE 1:1).

Ausbeute: 431 mg (0,95 mmol, 54%)

3-Tolyloxy-1'- β -D-glucopyranosid 30



241 mg (0,55 mmol) geschütztes Glucopyranosid **51** werden in 20 ml MeOH gelöst. Es werden 0,5 ml (3 mmol) einer 30 % Lsg. von NaOMe in MeOH zugegeben. Die Reaktion wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Amberlite IRC neutralisiert. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/MeOH 8:1, R_f=0,34).

Ausbeute: 131 mg (0,48 mmol, 88%)

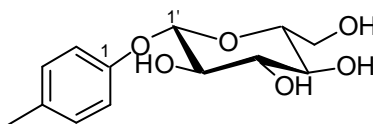
(Identifizierung durch Vergleich mit IR-Banden aus der Literatur^[81])

¹H-NMR (CD₃OD) **d** [ppm]: 7,18 (t, 1H, J=7,9, H5); 6,96 (s, 1H, H2); 6,93 (d, 1H, J=7,6, H6); 6,87 (d, 1H, J=7,6, H4); 4,92 (d, 1H, J=7,6, H1'); 3,93 (dd, 1H, J₁=12,3, J₂=2,2, H6'); 3,74 (dd, 1H, J₁=12,0, J₂=5,0, H6'); 3,55-3,35 (m, 4H, H2', H3', H4'); 2,35 (s, 3H, H7)

¹³C-NMR (CD₃OD) **d** [ppm]: 159,3 (C1); 140,7 (C3); 130,7 (C5); 124,2 (C4); 118,6 (C2); 114,8 (C3); 102,4 (C1'); 78,2 (C2'); 78,1 (C5'); 75,1 (C3'); 71,5 (C4'); 62,6 (C6'); 21,6 (C7)

IR (KBr-Film) **v** [cm⁻¹]: 3050 (m, **v**(C-H)_{ar}); 2963 (m, **v**(C-H)_{al}); 2922 (m, **v**(C-H)_{al}, **v**(C-H)_{al}); 2889 (m, **v**(C-H)_{al}); 2854 (m, **v**(C-H)_{al}); 1606 (m, **v**(C=C)_{ar}); 1596 (m); 1587 (m, **v**(C=C)_{ar}); 1490 (m, **v**(C=C)_{ar}); 1461 (m); 1410 (m); 2362 (m); 1295 (m); 1258 (s); 1172 (m); 1103 (s); 1071 (s); 1048 (s); 1029 (s); 924 (w); 881 (w, **γ**(C-H)_{ar}); 778 (m, **γ**(C-H)_{ar}); 767 (m); 749 (m); 688 (m); 647 (m)

4-Tolyloxy-1'-**b**-D-glucopyranosid **34**



138 mg geschütztes Glucopyranosid **52** werden in 20 ml MeOH gelöst. Es werden 0,5 ml (3 mmol) einer 30 % Lsg. von NaOMe in MeOH zugegeben. Es wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Amberlite IRC neutralisiert. Reinigung erfolgt über Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/MeOH 4:1).

Ausbeute: 73 mg (0,27 mmol, 87,3% bezogen auf Acetimidat)

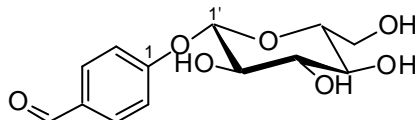
(Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur^[82])

¹H-NMR (D₂O) **δ** [ppm]: 7,15 (d, 2H, J=8,2, H3/5); 6,98 (d, 2H, J=8,2, H2/6); 4,98 (d, 1H, J=7,6, H1'); 3,65 (dd, 1H, J₁=12,6, J₂=2,5, H6'); 3,68 (dd, 1H, J₁=12,6, J₂=5,7, H6'); 3,73-3,56 (m, 4H, H2', H3', H4', H5'); 2,23 (s, 3H, H7)

¹³C-NMR (D₂O) **δ** [ppm]: 155,4 (C1); 134,3 (C4); 131,2 (C3/5); 117,6 (C2/6);

101,5 (C1'); 77,1 (C2'); 76,6 (C5'); 74,0 (C3'); 70,5 (C4'); 61,6 (C6'); 20,6 (C7)

4-Formyl-phenoxy-1'- β -D-glucopyranosid 32



212 mg (0,47 mmol) geschütztes Glucopyranosid **53** werden in 20 ml MeOH gelöst. Es werden 0,5 ml (3 mmol) einer 30 % Lsg. von NaOMe in MeOH zugegeben. Es wird 12h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Amberlite IRC neutralisiert. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/MeOH 4:1, $R_f=0,38$).

Ausbeute: 133 mg (0,46 mmol, 49 %)

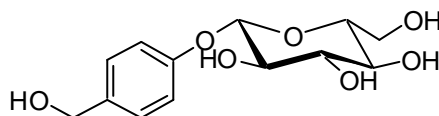
(Identifizierung durch Vergleich mit IR-Banden aus der Literatur^[83])

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 9,91 (s, 1H, H7); 7,92 (d, 2H, $J=8,8$, H3/H5); 7,29 (d, 2H, $J=8,8$, H2/H6); 5,10 (d, 1H, $J=6,9$, H1'); 3,95 (dd, 1H, $J_1=12,0$, $J_2=2,5$, H6'); 3,75 (dd, 1H, $J_1=12,0$, $J_2=5,7$, H6'); 3,56-3,43 (m, 4H, H2', H3', H4', H5')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 193,0 (C7); 164,1 (C1); 133,0 (C3/C5); 132,7 (C4); 117,9 (C2/C6); 101,6 (C1'); 78,4 (C2'); 78,0 (C5'); 74,9 (C3'); 71,3 (C4'); 62,5 (C6')

IR (KBr-Film) ν [cm^{-1}]: 2966 (w, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$); 2934 (m, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$); 2888 (m, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$); 2856 (m, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$); 2830 (m, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$); 1687 (s, $\nu(\text{C=O})$); 1605 (s, $\nu(\text{C=C})$); 1584 (s, $\nu(\text{C=C})$); 1507 (s, $\nu(\text{C=C})$); 1405 (m); 1362 (s); 1307 (m); 1243 (s); 1166 (m); 1098 (s); 1068 (s); 1046 (s); 1008 (s); 896 (m); 860 (m); 835 (m, $\gamma(\text{C-H})_{\text{ar}}$); 662 (m)

4-Hydroxymethylphenoxy-1'- β -D-glucopyranosid 33



100 mg (3,8 mmol) LiAlH_4 werden in 25 ml THF suspendiert und eine Lsg. des 219 mg (0,48 mmol) geschützten Glucopyranosids **53** in 2 ml THF wird langsam

zugetropft. Die Reaktion wird für 1h auf Rückfluss erhitzt und dann abgekühlt. Unter Eiskühlung wird vorsichtig mit Eiswasser hydrolysiert. Der entstandene LiOH/Al(OH)₃-Niederschlag wird abfiltriert und die wässrige Lsg. mit Amberlite IRC neutralisiert. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/MeOH 2:1, R_f=0,56).

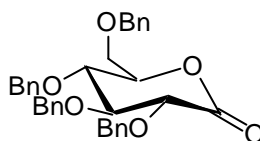
Ausbeute: 43 mg (0,15 mmol, 31%)

(Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur^[84])

¹H-NMR (CD₃OD) δ [ppm]: 7,18 (d, 2H, J=8,2, H3/H5); 6,98 (d, 2H, J=8,8, H2/H6); 4,79 (d, 1H, J=7,6, H1'); 4,44 (s, 2H, H7); 3,79 (dd, 1H, J₁=12,3, J₂=2,2, H6'); 3,60 (dd, 1H, J₁=12,0, J₂=5,7, H6'); 3,51-3,40 (m, 4H, H2', H3', H4', H5')

¹³C-NMR (CD₃OD) δ [ppm]: 158,6 (C1); 136,8 (C4); 129,5 (C3/C5); 117,8 (C2/C6); 102,6 (C1'); 78,2 (C2'); 78,1 (C5'); 75,0 (C3'); 71,5 (C4'); 64,9 (C7); 62,6 (C6')

2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-gluconolacton **54**



177,6 µl (2,04 mmol) Oxalylchlorid werden in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst und auf –78°C gekühlt. Dann werden 287,3 µl (4,07 mmol) DMSO in 5 ml CH₂Cl₂ zugetropft und 5 min. gerührt. 1 g (1,85 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-D-glucopyranose **55** werden in 10 ml CH₂Cl₂ gelöst und ebenfalls zu der Reaktion getropft. Es entsteht ein farbloser Niederschlag. Nach weiteren 15 min werden 1,29 ml (9,25 mmol) Triethylamin in 5 ml CH₂Cl₂ zugetropft. Die Lsg. wird wieder klar und schwach gelblich. Die Reaktionsmischung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Dann wird sie mit H₂O gewaschen und die wässrige Phase wird dreimal mit Et₂O reextrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden nacheinander mit 1%-iger HCl, H₂O, 5%-iger NaHCO₃ und H₂O gewaschen. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Et₂O/PE 1:2, R_f=0,23).

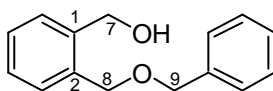
Ausbeute: 871 mg (1,62 mmol, 88 %)

(Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur^[85])

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7,40-7,15 (m, 20H, Bn); 4,98 (d, 1H, $J=11,4$, H5); 4,75-4,42 (m, 8H, Bn); 4,12 (d, 1H, $J=6,5$, H2); 3,95 (t, 1H, $J=8,2$, H3); 3,91 (t, 1H, $J=6,5$, H4); 3,72 (dd, 1H, $J_1=10,9$, $J_2=2,2$, H6); 3,67 (dd, 1H, $J_1=10,9$, $J_2=3,3$, H6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 169,3 (C=O); 137,6 ($(\text{C}_{\text{subst}})_{\text{ar}}$); 137,5 ($(\text{C}_{\text{subst}})_{\text{ar}}$); 137,5 ($(\text{C}_{\text{subst}})_{\text{ar}}$); 136,9 ($(\text{C}_{\text{subst}})_{\text{ar}}$); 128,4 (C_{ar}); 128,4 (C_{ar}); 128,4 (C_{ar}); 128,1 (C_{ar}); 127,97 (C_{ar}); 127,94 (C_{ar}); 127,89 (C_{ar}); 127,79 (C_{ar}); 80,9 (C_{al}); 78,1 (C_{al}); 77,4 (C_{al}); 76,1 (C_{al}); 73,9 (C_{al}); 73,7 (C_{al}); 73,7 (C_{al}); 73,5 (C_{al}); 68,2 (C_{al})

(2-Benzoyloxymethyl-phenyl)-methanol 57



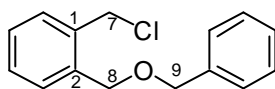
1,2 g (8,7 mmol) (2-Hydroxymethyl-phenyl)-methanol **56** und 83 mg (0,5 mmol) KI werden in 50 ml THF gelöst. 400 mg (10 mmol) einer 60% Suspension von NaH in Paraffinöl werden 2 mal mit PE gewaschen, in 50 ml THF suspendiert und dann zu der Reaktion gegeben. Dabei tritt deutliche Gasentwicklung auf. Die Lsg. wird 10 min. bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden 1,2 ml (10 mmol) Benzylbromid in 50 ml THF zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird in Eiswasser gegeben und mit 10 % H_2SO_4 neutralisiert. Die wässrige Phase wird 3 mal mit Et_2O extrahiert. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}$ 4:3, $R_f=0,43$).

Ausbeute: 1,278 g (5,6 mmol, 64%)

(Identifizierung durch Vergleich mit $^1\text{H-NMR}$ -Daten aus der Literatur^[86])

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7,45-7,29 (m, 9H, H_{ar}); 4,68 (d, 2H, $J=3,7$, H7); 4,66 (s, 2H, H8/9); 4,60 (s, 2H, H8/9); 3,10 (bs, 1H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 140,5 (C1); 137,3 (C10); 135,8 (C2); 130,0 (C_{ar}); 129,6 (C_{ar}); 128,8 (C_{ar}); 128,5 (C_{ar}); 128,0 (C_{ar}); 127,9 (C_{ar}); 127,9 (C_{ar}); 72,5 (C9); 71,2 (C8); 63,6 (C7)

1-Chloromethyl-phenylmethoxymethyl-benzen 58

1 g (4,4 mmol) (2-Benzyloxymethyl-phenyl)-methanol **57** werden in 10 ml CH₃CN gelöst. Nacheinander werden 1,5 g (6,1 mmol) Ph₃P und 2 ml (20 mmol) CCl₄ bei Raumtemperatur zugegeben. Die Reaktion wird 4h gerührt. Dabei tritt eine leichte Gelbfärbung auf. Aufreinigung erfolgt per Säulenchromatographie an Kieselgel (Et₂O/PE 1:8, R_f=0,4).

Ausbeute: 915 mg (3,7 mmol, 84%)

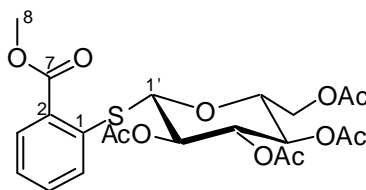
¹H-NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 7,31-7,18 (m, 9H, H_{ar}); 4,60 (s, 2H, CH₂); 4,59 (s, 2H, CH₂); 4,48 (s, 2H, CH₂)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 138 (C_{ar}); 136,6 (C_{ar}); 136,1 (C_{ar}); 130,3 (C_{ar}); 129,6 (C_{ar}); 128,8 (C_{ar}); 128,4 (C_{ar}); 127,8 (C_{ar}); 127,8 (C_{ar}); 72,5 (CH₂); 69,8 (CH₂); 43,7 (CH₂)

MS (MassSpec, EI) m/z (%): 246 (0,5, M); 210 (1, M-HCl); 181 (19); 157 (14); 155 (40); 140 (67); 138 (71); 119 (56); 107 (44); 104 (72, C₈H₈); 91 (100, C₇H₇); 79 (48); 77 (54, C₆H₅); 65 (52, C₅H₅); 63 (21); 51 (31)

IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 3068 (w, ν(CH)_{ar}); 3028 (w, ν(CH)_{ar}); 2975 (w, ν(CH₂)); 2949 (w, ν(CH₂)); 2898 (w, ν(CH₂)); 2858 (w, ν(CH₂)); 1494 (m, ν(CC)_{ar}); 1454 (m); 1365 (m); 1259 (m); 1064 (s); 938 (m); 793 (s); 772 (s, γ(CH)_{ar}); 743 (s, γ(CH)_{ar}); 698 (s, γ(C-H)_{ar}); 594 (m)

HR-MS gef: 246,0814; ber: 246,0811 für [C₁₅H₁₅OCl]

2-Methoxycarbonyl-phenylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid 63

4,08 g (9,9 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-bromglucopyranose **62** und 3 ml

(21,5 mmol) Triethylamin werden in 25 ml MeCN gelöst. Bei Zugabe von 1,5 ml (10,9 mmol) 2-Mercaptobenzoessäure **61** färbt sich das Reaktionsgemisch gelb. Nachdem die Reaktion 2 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, werden 50 ml CHCl_3 zugegeben, und die organische Phase wird dreimal mit Wasser gewaschen. Die Reinigung erfolgt über Umkristallisation aus Ethanol. Das Produkt fällt in Form von farblosen Nadeln an.

Ausbeute: 4,48 g (8,99 mmol; 91%)

Schmelzpunkt: 137,7°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 7,81 (d, 1H, $J=7,6$, H3); 7,52 (d, 1H, $J=8,2$, H6); 7,38 (t, 1H, $J=7,6$, H4); 7,28 (t, 1H, $J=7,6$, H5); 5,21 (t, 1H, $J=9,1$, H3'); 5,09 (dd, 1H, $J=9,5$, H2'/4'); 5,08 (dd, 1H, $J=9,5$, H2'/4'); 4,82 (d, 1H, $J=10,1$, H1'); 4,17 (dd, 1H, $J_1=12,6$, $J_2=5,7$, H6'); 4,10 (d, 1H, $J=12,0$, H6'); 3,82 (s, 3H, H8); 3,75 (ddd, 1H, $J_1=8,7$, $J_2=6,5$, $J_3=1,7$, H5'); 2,01 (s, 3H, CH_3); 1,97 (s, 3H, CH_3); 1,96 (s, 3H, CH_3); 1,94 (s, 3H, CH_3)

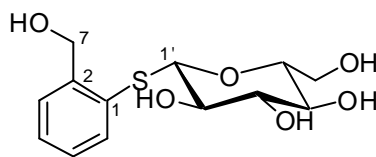
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 170,5 (C=O); 170,2 (C=O); 169,4 (C=O); 169,1 (C=O); 166,8 (C7); 136,5 (C1); 132,2 (C5); 130,9 (C3); 130,7 (C2); 129,5 (C6); 126,4 (C4); 84,4 (C1'); 75,7 (C2'); 74 (C3'); 69,8 (C5'); 68,3 (C4'); 62,3 (C6'); 52,2 (C8); 20,7 (CH_3); 20,6 (CH_3); 20,6 (CH_3); 20,5 (CH_3)

IR (KBr) ν [cm^{-1}]: 2986 (w, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$), 2953 (m, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$), 1757 (bs, $\nu(\text{C=O})$), 1713 (s, $\nu(\text{C=O})$), 1587 (m, $\nu(\text{C=C})_{\text{ar}}$), 1564 (m), 1466 (s), 1437 (s), 1367 (s), 1232 (bs), 1142 (m), 1114 (s), 1092 (s), 1053 (bs), 908 (m), 830 (m), 751 (m, $\gamma(\text{C-H})_{\text{ar}}$), 610 (m), 600 (m), 571 (m), 528 (m)

MS (*MassSpec*, *EI*) m/z (%): 467(15, M- OCH_3), 332(50), 331(100, $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})_4$), 271(17), 229(17), 211(16), 187(15), 170(39), 169(55), 167(57, $\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_3$), 152(25), 145(28), 139(40), 137(37), 136(68, $\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}$), 127(73), 115(29), 109(71, SC_6H_4), 97(34), 81(24), 69(17)

HR-MS gef.: 499,1278; ber.: 499,1274 für $[\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_{11}\text{S}+\text{H}]$

2-Hydroxymethyl-phenylsulfanyl-1'-thio-**b**-D-glucopyranosid **38**



In einem 50 ml Zweihalskolben werden 15 ml THF vorgelegt. Dann werden 120 mg (3,2 mmol) LiAlH_4 zugegeben. Unter Eiskühlung wird langsam eine Lösung von 500 mg (1 mmol) Glucopyranosid **63** in 15 ml THF zugetropft. Anschließend wird die Reaktion erhitzt und 2 h refluxiert. Nach dem Abkühlen werden dann nacheinander unter Eiskühlung 0,15 ml Wasser, 0,15 ml 15 % Natronlauge und 0,45 ml Wasser zugegeben. Der dabei entstehende weiße Niederschlag wird abfiltriert und mehrfach mit Methanol gewaschen. Die Reinigung erfolgt durch MPLC an einer RP18-Phase mit einem Gemisch aus $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ als Elutionsmittel. Detektion erfolgt per UV-Detektor bei 230 nm. Das Produkt ist ein farbloser Feststoff.

Ausbeute: 147mg (0,49mmol; 50%)

Schmelzpunkt: 199,1°C

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 7,74 (dd, 1H, $J_1=7,6$, $J_2=1,3$, H6); 7,46 (dd, 1H, $J=7,6$, 1,3, H3); 7,32 (td, 1H, $J_1=7,5$, $J_2=1,4$, H5); 7,27 (td, 1H, $J_1=7,5$, $J_2=1,5$, H4); 4,88 (d, 1H, $J=12,8$, H7); 4,74 (d, 1H, $J=12,8$, H7); 4,49 (d, 1H, $J=9,8$, H1'); 3,85 (dd, 1H, $J_1=11,9$, $J_2=2,1$, H6'); 3,65 (dd, 1H, $J_1=12,2$, $J_2=5,5$, H6'); 3,36 (dd, 1H, $J=8,7$, H3'); 3,30-3,22 (m, 2H, H2', H5'); 3,16 (dd, 1H, $J_1=9,6$, $J_2=8,7$, H4')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 144,9 (C2); 135,8 (C1); 132,8 (C5); 129,8 (C3); 129,5 (C6); 129,2 (C4); 89,8 (C1'); 82,2 (C5'); 79,7 (C3'); 73,8 (C2'); 71,5 (C4'); 63,8 (C7); 63,0 (C6')

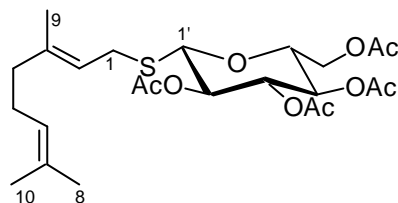
MS (LCQ/APCI) m/z (%): 303,9(20, $\text{M}+\text{H}$), 285,0(8), 267,1(24), 249,1(29), 231,2(23), 213,3(5%), 164,3(100, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5+\text{H}$), 140(57, $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}+\text{H}$)

IR (KBr) ν [cm^{-1}]: >3200(b, $\nu(\text{O-H})$), 3100 (w, $\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$), 3063 (w, $\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$), 3052 (w, $\nu(\text{C-H})_{\text{ar}}$), 2943 (m, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$), 2887 (m, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$), 1587 (m, $\nu(\text{C}=\text{C})_{\text{ar}}$), 1473 (m), 1459 (m), 1445 (m), 1429 (m), 1365 (m), 1332 (m), 1312 (m), 1246 (m), 1213 (m), 1180 (m), 1103 (s), 1086 (s), 1070 (s), 1037 (s), 1000 (s), 881 (m), 751 (s, $\gamma(\text{C-H})_{\text{ar}}$)

HR-MS

gef.: 303,0902; ber.: 303,0902 für $[C_{13}H_{18}O_6S+H]$

3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1'-thio-***b***-*D*-glucopyranosid **67**



1,07 g (3,05 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-thio- α -*D*-glucopyranose **65** und 850 μ l (6 mmol) Triethylamin werden in 15 ml Acetonitril gelöst und 1/2h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung verfärbt sich dabei schwach gelblich. Dann werden 675 μ l (3,4 mmol) Geranyl bromid **66** zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 50 ml $CHCl_3$ wird die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen. Man erhält ein bräunliches Öl, das nicht mehr aufgereinigt wird.

Ausbeute: 1,523g (3,05 mmol; 100%)

1H -NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 5,20-5,15 (m, 1H, H2); 5,17 (dd, 1H, $J=9,4$, H3'); 5,05 (s, 1H, H6); 5,04 (dd, 1H, $J=9,9$, H4'); 5,02 (dd, 1H, $J=9,6$, H2'); 4,40 (d, 1H, $J=10,1$, H1'); 4,20 (dd, 1H, $J_1=12,4$, $J_2=5,0$, H6'); 4,10 (dd, 1H, $J_1=12,4$, $J_2=2,3$, H6'); 3,59 (ddd, 1H, $J_1=10,1$, $J_2=5,0$, $J_3=2,3$, H5'); 3,46 (dd, 1H, $J_1=13,0$, $J_2=9,2$, H1); 3,13 (dd, 1H, $J_1=13,0$, $J_2=6,7$, H1); 2,10-1,90 (m, 4H, H4, H5); 2,04 (s, 3H, OAc); 2,02 (s, 3H, OAc); 1,99 (s, 3H, OAc); 1,97 (s, 3H, OAc); 1,66 (s, 3H, H8); 1,63 (s, 3H, H9); 1,58 (s, 3H, H10)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ [ppm]: 170,6 (C=O); 170,2 (C=O); 169,3 (C=O); 140,3 (C3); 131,8 (C7); 123,7 (C6); 118,9 (C2); 82,0 (C1'); 75,8 (C5'); 73,9 (C3'); 69,8 (C2'); 68,4 (C4'); 62,2 (C6'); 39,5 (C4); 27,2 (C1); 26,4 (C5); 25,7 (C8); 20,7 (Acetyl- CH_3); 20,6 (Acetyl- CH_3); 20,5 (Acetyl- CH_3); 17,7 (C10); 15,8 (C9)

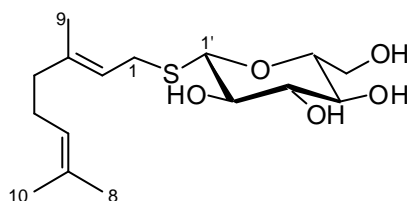
IR (KBr) ν [cm^{-1}]: 3023,0 (m, $\nu(CH)_{ol}$); 2970 (s, $\nu(CH)_{al}$); 2937 (s, $\nu(CH)_{al}$); 2863 (s, $\nu(CH)_{al}$); 1743 (s, $\nu(C=O)_{ester}$); 1434 (s); 1368 (s); 1220 (bs); 1089 (s); 1039 (s); 980 (m); 958 (m); 912 (s); 830 (m, $\gamma(CH)_{ol}$); 755 (s); 599 (m)

MS (MassSpec, EI) m/z (%): 500(1, M); 331(69, $C_6H_7(OAc)_4$); 271(12) 229(10); 211(15) 169(100, $C_{10}H_{17}S$); 139(24); 136(38, $C_{10}H_{16}$); 127(50); 109(76); 97(21);

93(34); 81(44); 69(66)

HR-MS gef.: 501,2165; ber.: 501,2185 für $[C_{24}H_{36}O_9S+H]$

*3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio-**b**-D-glucopyranosid 39*



1,45 g (2,9 mmol) geschütztes Glucopyranosid **67** wurden in 15 ml MeOH gelöst und es werden 0,5 ml (3 mmol) einer 30 % Lsg. von NaOMe in MeOH zugegeben. Es wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Amberlite IRC 50 neutralisiert. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie.

Ausbeute: 807 mg (2,42 mmol; 84%)

1H -NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 5,23 (dd, 1H, $J_1=7,9$, $J_2=6,9$, H2); 5,07 (tt, 1H, $J_1=6,9$, $J_2=1,4$, H6); 4,26 (d, 1H, $J=9,8$, H1'); 3,81 (dd, 1H, $J_1=12,1$, $J_2=2,2$, H6'); 3,63 (dd, 1H, $J_1=12,1$, $J_2=5,7$, H6'), 3,52 (dd, 1H, $J_1=13,0$, $J_2=9,2$, H1); 3,30-3,25 (m, 2H, H3', H4'); 3,20-3,12 (m, 3H, H2', H5', H1); 2,08 (dt, 2H, $J=7,3$, H5); 2,01 (t, 2H, $J=7,3$, H4); 1,65 (s, 3H, H8); 1,64 (s, 3H, H9); 1,57 (s, 3H, H10)

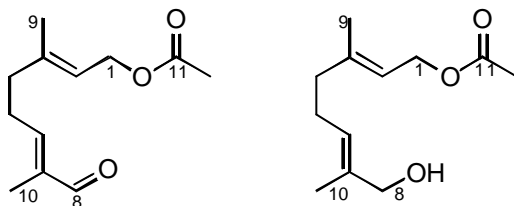
^{13}C -NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 140,5 (C3); 132,6 (C7); 125,2 (C6); 121,5 (C2); 85,7 (C1'); 82,1 (C5'); 79,8 (C3'); 74,3 (C2'); 71,6 (C4'); 63,0 (C6'); 40,8 (C4); 28,1 (C1); 27,7 (C5); 26,0 (C8); 17,9 (C10); 16,1 (C9)

IR (KBr) ν [cm^{-1}]: >3100 (b, $\nu(O-H)$), 2969 (m, $\nu(C-H)_{al}$), 2923 (s, $\nu(C-H)_{al}$), 2856 (m, $\nu(C-H)_{al}$), 1661 (w), 1444 (m), 1381 (m), 1272 (w), 1234 (w), 1100 (s, $\nu(C-O)$), 1045 (s, $\nu(C-O)$), 1020 (s, $\nu(C-O)$), 882 (w), 823 (w, $\gamma(C=C-H)$), 618 (w), 580 (m)

MS (APCI) m/z (%): 333,1(98, $M+H$); 315,5(100, $M+H-H_2O$); 297,5(8, $M+H-2(H_2O)$), 279,5(4, $M+H-3(H_2O)$), 137,4(5, $C_{10}H_{17}$)

HR-MS gef.: 333,1725; ber.: 333,1735 für $[C_{16}H_{28}O_5S+H]$

Essigsäure-3,7-dimethyl-8-oxo-octa-2,6-dienyl-ester **69**/ *Essigsäure-8-hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienyl-ester* **70**



375 mg (3,2 mmol) SeO_2 werden in 30 ml CH_2Cl_2 suspendiert. Dazu werden 3 ml (14 mmol) Geranylacetat **68** und 3 ml (16,5 mmol) einer 5,5 M, wasserfreien Lsg. von *t*-Butylhydroperoxid in Nonan gegeben. Es wird 3h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Gemisch abfiltriert und das Lösemittel abdestilliert. Es bleibt ein gelbes Öl übrig, das in Et_2O aufgenommen wird und zweimal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen wird. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel ($\text{Et}_2\text{O}/\text{PE}$ 1:1, $R_f(\text{Aldehyd})=0,49$, $R_f(\text{Alkohol})=0,25$)

(Identifizierung durch Vergleich mit ^1H -NMR-Daten aus der Literatur^[87,88])

Ausbeute: **69**: 876 mg (4,1 mmol, 30%)

70: 602 mg (2,9 mmol, 21%)

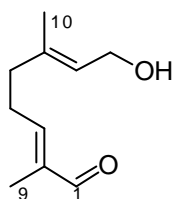
69:

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3Cl) δ [ppm]: 5,33 (td, 1H, $J_1=6,7$, $J_2=1,0$, H2/6); 5,30 (td, 1H, $J_1=7,1$, $J_2=1,0$, H2/6); 4,54 (d, 2H, $J=7,3$, H1); 3,94 (s, 2H, H8); 2,13 (q, 2H, $J=7,4$, H5); 2,05 (t, 2H, $J=7,3$, H4); 2,01 (s, 3H, H12); 1,67 (s, 3H, H9/10); 1,62 (s, 3H, H9/10)

70:

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3Cl) δ [ppm]: 9,33 (s, 1H, H7); 6,39 (t, 1H, $J=7,2$, H6); 5,33 (t, 1H, $J=7,0$, H2); 4,53 (d, 2H, $J=7,0$, H1); 2,44 (q, 2H, $J=7,5$, H5); 2,18 (t, 2H, $J=7,5$, H4); 1,99 (s, 3H, CH_3); 1,69 (s, 6H, H9, H10)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3Cl) δ [ppm]: 195,0 (C8); 170,9 (C11); 153,3 (C6); 140,3 (C7); 139,6 (C3); 119,5 (C2); 61,0 (C1); 37,7 (C4); 26,9 (C5); 20,9 (C12); 16,2 (C9); 9,1 (C10)

8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienal 71

250 mg (1,2 mmol) 8-Oxogeranylacetat **70** werden in 3 ml MeOH gelöst. Dann werden 0,2 ml (0,16 mmol) einer 3% NaOMe-Lsg. zugegeben und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Amberlite IRC neutralisiert. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Et₂O/PE 3:2, R_f=0,15)

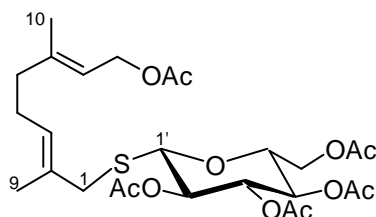
Ausbeute: 82 mg (0,49 mmol, 40%)

(Identifizierung durch Vergleich mit ¹H-NMR-Daten aus der Literatur^[88])

¹H-NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 9,37 (s, 1H, H8); 6,45 (td, 1H, J₁=7,2, J₂=1,0, H2); 5,44 (td, 1H, J₁=6,6, J₂=0,7, H6); 4,15 (t, 2H, J=7,4, H1); 2,48 (q, 2H, J=7,4, H5); 2,21 (t, 2H, J=7,7, H4); 1,73 (s, 3H, H9/10); 1,69 (s, 3H, H9/10)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 195,2 (C8); 153,6 (C6); 139,6 (C7); 137,8 (C3); 124,6 (C2); 59,2 (C1); 37,8 (C4); 27,1 (C5); 16,2 (C10); 9,2 (C9)

8-Acetoxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid 72



1,87 mg (7,4 mmol) ADDP werden im Ölpumpenvakuum getrocknet und in 40 ml THF gelöst. Unter Eiskühlung werden 7,4 ml (7,4 mmol) einer 1M Lösung von Trimethylphosphan in THF zugegeben. Die Lösung wird etwa eine 1/2h gerührt, bis sie sich von orange zu einem schwachen gelb entfärbt hat. 1,82 g (5 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-thio-α-D-glucopyranose **65** werden ebenfalls im Ölpumpenvakuum getrocknet und dann zusammen mit 779 mg (3,7 mmol)

8-Hydroxygeranylacetat **69** in 20 ml THF gelöst und bei Raumtemperatur zu der Reaktionsmischung gegeben. Dabei entsteht ein weißer Niederschlag. Das Gemisch wird für 2h bei Raumtemperatur gerührt, dann wird der Niederschlag abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in EE aufgenommen und mit PE das entstandene Hydrazid ausgefällt. Nach erneutem Abfiltrieren wird das Lösemittel wieder im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in CH_2Cl_2 aufgenommen und zweimal mit H_2O und einmal mit ges. NaHCO_3 -Lsg. gewaschen. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/PE 3:6, $R_f=0,17$). Man erhält ein schwach gelbliches, zähes Öl.

Ausbeute: 1,863 g (3,33 mmol; 90%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 5,34 (t, 1H, $J=6,9$, H7); 5,26 (t, 1H, $J=6,8$, H3); 5,17 (dd, 1H, $J=9,3$, H3'); 5,06 (dd, 1H, $J=9,1$, H4'); 5,02 (dd, 1H, $J=10,3$, H2'); 4,58 (d, 2H, $J=6,9$, H8); 4,38 (d, 1H, $J=10,1$, H1'); 4,21 (dd, 1H, $J_1=12,0$, $J_2=5,0$, H6'); 4,10 (dd, 1H, $J_1=11,5$, $J_2=2,5$, H6'); 3,57 (ddd, 1H, $J_1=9,6$, $J_2=4,9$, $J_3=2,1$, H5'); 3,35 (d, 1H, $J=12,9$, H1); 3,11 (d, 1H, $J=12,9$, H1); 2,21-2,12 (m, 2H, H4); 2,12-1,97 (m, 2H, H5); 2,06 (s, 3H, CH_3); 2,03 (s, 3H, CH_3); 2,01 (s, 3H, CH_3); 2,00 (s, 3H, CH_3); 1,98 (s, 3H, CH_3); 1,70 (s, 3H, C9/10); 1,66 (s, 3H, C9/10)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 171,0 (C=O); 170,5 (C=O); 170,2 (C=O); 169,3 (C=O); 169,28 (C=O); 141,5 (C6); 130,5 (C2); 128,6 (C3); 118,7 (C7); 81,8 (C1'); 75,7 (C5'); 73,9 (C3'); 69,8 (C2'); 68,4 (C4'); 62,2 (C6'); 61,2 (C8); 39,4 (C5); 39,2 (C1); 26,3 (C4); 21,0 (CH_3); 20,7 (CH_3); 20,6 (CH_3); 20,56 (CH_3); 20,5 (CH_3); 16,5 (C10); 14,7 (C9)

IR (KBr-Film) ν [cm^{-1}]: 2982 (m, $\nu(\text{CH})_{\text{al}}$); 2941 (m, $\nu(\text{CH})_{\text{al}}$); 2861 (m, $\nu(\text{CH})_{\text{al}}$); 2257 (w); 2113 (w); 1747 (bs, $\nu(\text{C=O})_{\text{ester}}$); 1430 (m); 1373 (s); 1237 (bs); 1084 (s); 1035 (bs); 980 (m); 957 (m); 912 (m); 828 (w); 734 (m); 606 (m)

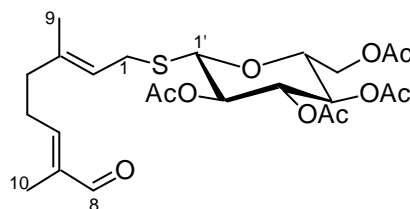
MS (MassSpec, EI) m/z (%): 332(9), 331(57, $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})_4$), 271(12), 229(6), 211(7), 169(100, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{S}$), 142(10), 139(9), 129(6), 127(16), 109(34), 97(9), 43(40)

HR-MS (Quattro) gef: 581,2034; ber: 581,2033 für $[\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{11}\text{S}+\text{Na}]$

(Na-Addukt entsteht durch Spuren von Na^+ im Produkt oder LM. Durch die hohe Polarität des Zuckers entsteht ein stabiler Komplex, der im Gegensatz zu dem

M+H-Ion unter den gewählten Bedingungen nicht zerfällt.)

3,7-Dimethyl-8-oxo-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 73



Die Darstellung erfolgt analog zu **72**.

Ansatz: 883 mg (3,5 mmol) ADDP, 3,5 ml (3,5 mmol) einer 1M Lsg. von Trimethylphosphan, 729 mg (2 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-thio- α -D-glucopyranose **65**, 294 mg (1,75 mmol) 8-Oxogeraniol. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (EE/PE 3:7, $R_f=0,15$). Man erhält ein schwach gelbliches, zähes Öl.

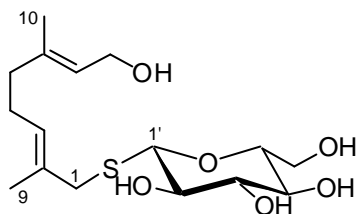
Ausbeute: 344 mg (0,67 mmol; 38%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 9,37 (s, 1H, H8); 6,43 (t, 1H, $J=7,1$, H6); 5,24 (dd, 1H, $J=7,9$, H2); 5,18 (dd, 1H, $J=9,1$, H3'); 5,04 (dd, 2H, $J=9,9$, H2', H4'); 4,41 (d, 1H, $J=10,1$, H1'); 4,22 (dd, 1H, $J_1=12,3$, $J_2=5,0$, H6'); 4,12 (dd, 1H, $J_1=12,3$, $J_2=2,2$, H6'); 3,63 (ddd, 1H, $J_1=9,9$, $J_2=4,7$, $J_3=2,4$, H5'); 3,44 (dd, 1H, $J_1=12,9$, $J_2=8,8$, H1); 3,21 (dd, 1H, $J_1=12,8$, $J_2=7,1$, H1); 2,47 (td, 2H, $J=7,4$, H5); 2,21 (t, 2H, $J=7,6$, H4); 2,03 (s, 3H, CH_3); 2,02 (s, 3H, CH_3); 2,00 (s, 3H, CH_3); 1,98 (s, 3H, CH_3); 1,73 (s, 3H, H9/10); 1,68 (s, 3H, H9/10)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 195,0 (C8); 170,5 (C=O); 170,1 (C=O); 169,4 (C=O); 169,3 (C=O); 153,3 (C6); 139,6 (C7); 138,6 (C3); 120,2 (C2); 82,1 (C1'); 75,9 (C5'); 73,8 (C3'); 69,7 (C2'); 68,3 (C4'); 62,2 (C6'); 37,8 (C4); 27,1 (C1); 26,8 (C5); 20,7 (CH_3); 20,6 (CH_3); 20,55 (CH_3); 20,5 (CH_3); 15,8 (C9); 9,2 (C10)

IR (KBr-Film) ν [cm^{-1}]: 2960 (w, $\nu(\text{CH})_{\text{ald}}$); 2937 (w, $\nu(\text{CH})_{\text{ald}}$); 2858 (w, $\nu(\text{CH})_{\text{al}}$); 1755 (s, $\nu(\text{C=O})_{\text{ester}}$); 1683 (m, $\nu(\text{C=O})_{\text{ald}}$); 1435 (w); 1374 (m); 1224 (s); 1090 (m); 1039 (s); 915 (w); 804 (w); 595 (w)

MS (MassSpec, EI) m/z (%): 332(5), 331(22, $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6(\text{C}_2\text{H}_3\text{O})_4$), 271(6), 229(4), 211(5), 169(66), 142(12), 139(11), 129(5), 127(19), 109(36), 97(11), 43(100)

*HR-MS*gef: 537,1788; ber: 537,1770 für $[C_{24}H_{34}O_{10}S+Na]$ *8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid 40*

1,22 g (2,2 mmol) des geschützten Glucopyranosids **72** werden in 10 ml MeOH gelöst und mit 0,5 ml (3 mmol) einer 30%-igen NaOMe-Lsg. versetzt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Amberlite IRC50 neutralisiert. Reinigung erfolgt über MPLC.

Ausbeute: 551 mg (1,58 mmol, 72 %)

1H -NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 5,37 (t, 1H, $J=5,8$, H3/7); 5,35 (t, 1H, $J=6,8$, H3/7); 4,26 (d, 1H, $J=9,8$, H1'); 4,10 (d, 2H, $J=6,3$, H8); 3,85 (dd, 1H, $J_1=12,1$, $J_2=2,1$, H6'); 3,65 (dd, 1H, $J_1=12,0$, $J_2=5,8$, H6'); 3,51 (d, 1H, $J=12,9$, H1); 3,37-3,30 (m, H3'/H5'/MeOH- d_4); 3,24 (dd, 1H; $J=8,4$, H4'); 3,19 (ddd, 1H, $J_1=8,58$, $J_2=6,2$, $J_3=1,8$, H2'); 3,11 (d, 1H, $J=12,9$, H1); 2,27-2,12 (m, 2H, H4); 2,09 (t; 2H, $J=7,1$, H5); 1,74 (s, 3H, H9/10); 1,68 (s, 3H, H9/10)

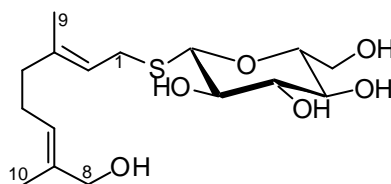
^{13}C -NMR (CD_3OD) δ [ppm]: 139,0 (C6); 132,1 (C2); 129,3 (C3); 125,2 (C7); 84,9 (C1'); 81,9 (C5'); 79,8 (C3'); 74,2 (C2'); 71,6 (C4'); 63,0 (C6'); 59,5 (C8); 40,4 (C5); 39,8 (C1); 27,4 (C4); 16,4 (C10); 15,2 (C9)

IR (KBr) ν [cm^{-1}]: >3100 (b, $\nu(O-H)$), 2965 (m, $\nu(C-H)_{al}$), 2930 (m, $\nu(C-H)_{al}$), 2912 (m, $\nu(C-H)_{al}$), 2868 (m, $\nu(C-H)_{al}$), 1491 (m), 1458 (m), 1437 (m), 1419 (m), 1386 (m), 1354 (m), 1289 (m), 1252 (m), 1217(m), 1180 (m), 1122 (s, $\nu(C-O)$), 1105 (s, $\nu(C-O)$), 1079 (s, $\nu(C-O)$), 1066 (s, $\nu(C-O)$), 1035 (s, $\nu(C-O)$), 1003 (s, $\nu(C-O)$), 982 (s, $\nu(C-O)$), 892 (m), 877 (m), 851 (m), 823 (m, $\gamma(C=C-H)$), 792 (m, $\gamma(C=C-H)$)

MS (APCI) m/z (%): 365,9(5, $M+H_2O$); 348,1(2, M); 331,0(100, $M+H-H_2O$); 313,4(30); 169,3(12, $C_{10}H_{17}S$); 135,3(6, $C_{10}H_{15}$)

*HR-MS*gef:349,1672; ber:349,1685 für $[C_{16}H_{28}O_6S+H]$

8-Hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio-**b**-D-glucopyranosid **41**



236 mg (0,46 mmol) gesch. Glucopyranosid **73** werden im Ölpumpenvakuum getrocknet und in 5 ml THF aufgenommen. Es werden 2,3 ml (1,38 mmol) einer 0,6 M Lsg. von AlH_3 in THF zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden nacheinander 0,5 ml H_2O , 0,5 ml NaOH (15%) und 1,5 ml H_2O zugegeben. Die Lösung wird filtriert und der Niederschlag mit THF und MeOH gewaschen. Das Lösemittel wird im Vakuum abdestilliert. Die Reinigung erfolgt über MPLC (RP18-Phase, MeOH/ H_2O 1:2, Detektion über UV: 230 nm).

Ausbeute: 145 mg (0,42 mmol; 91%)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 5,39 (t, 1H, $J_1=6,9$, $J_2=1,1$, H2/6); 5,29 (dd, 1H, $J_1=8,9$, $J_2=6,9$, H2/6); 4,29 (d, 1H, $J=9,8$, H1'); 3,92 (s, 2H, H8); 3,85 (dd, 1H, $J_1=12,1$, $J_2=2,3$, H6'); 3,67 (dd, 1H, $J=12,1$, $J_2=5,7$, H6'); 3,58 (dd, 1H, $J_1=13,2$, $J_2=9,4$, H1); 3,33-3,29 (m, 2H, H3'/4'); 3,24-3,14 (m, 3H, H8/2'/5'); 2,22-2,18 (m, 2H, H5); 2,10 (t, 2H, $J=7,1$, H4); 1,70 (s, 3H, H9/10); 1,65 (s, 3H, H9/10)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ [ppm]: 140,1 (C3); 136,4 (C7); 126,1 (C6); 121,8 (C2); 85,6 (C1'); 82,1 (C5'); 79,8 (C3'); 74,3 (C2'); 71,6 (C4'); 68,9 (C8); 63,0 (C6'); 40,4 (C4); 28,1 (C1); 27,1 (C5); 16,1 (C9); 13,9 (C10)

IR (KBr) ν [cm^{-1}]: 3406 (b, $\nu(\text{O-H})$); 2965 (s, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$); 2924 (s, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$); 2869 (m, $\nu(\text{C-H})_{\text{al}}$); 1659 (w, $\nu(\text{C=C})$); 1638 (w, $\nu(\text{C=C})$); 1442 (s); 1385 (m); 1354 (m); 1324 (w); 1279 (w); 1261 (w); 1232 (w); 1201 (w); 1136 (m); 1119 (s, $\nu(\text{C-O})$); 1069 (s, $\nu(\text{C-O})$); 1049 (s, $\nu(\text{C-O})$); 1024 (s, $\nu(\text{C-O})$); 924 (w); 904 (w); 881 (w); 870 (w); 815 (w); 701 (w); 615 (w); 581 (m)

MS m/z (%): 365,9(52, $\text{M}+\text{H}_2\text{O}$); 348,9(8, $\text{M}+\text{H}$); 331,0(100, $348,9-\text{H}_2\text{O}$); 313,1(24, $348,9-2\text{H}_2\text{O}$); 295,1(5, $348,9-3\text{H}_2\text{O}$); 251,1(6); 169,1(7, $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{S}$); 135,2(4, $\text{C}_{10}\text{H}_{15}$)

HR-MS gef:349,1668; ber:349,1685 für $[\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{S}+\text{H}]$

5.4 Analytischer Teil

5.4.1 LC-MS-Parameter für die Analyse von Thioglucosiden

Für die LC-MS-Messungen wurden folgende Einstellungen verwendet:

HPLC-Parameter:

Injektionsvolumen: 30 µl

Laufmittel A: H₂O mit 0,5 % CH₃COOH

B: MeCN mit 0,5 % CH₃COOH

Flussrate: 0,25 ml/min

Maximaldruck: 350 bar

UV-Detektor: **38:** 254 nm

39, 40, 41: 224 nm

Gradient:

Zeit [min]	Laufmittel B [%]
0,00	2,0
20,00	100,0
28,00	100,0
28,10	2,0
33,00	2,0

Tabelle 10: Gradient bei der HPLC

Nach Beendigung dieses Gradientenprogramms ist die Säule wieder equilibriert, so dass der Autosampler die nächste Messung starten kann.

APCI und MS Einstellungen:

Alle Messungen wurden im Positiv-Ionenmodus durchgeführt.

	38	39	40/41
Kapillar-Temp. [°C]	190	190	205
Verdampfer-Temp. [°C]	560	570	430
Reaktandgas Flussrate [rel.]	40	40	40
Hilfsgas Flussrate [rel.]	4	4	5
Quellenspannung [kV]	6	6	6
Quellenstrom [µA]	5	5	3
Kapillar-Spannung [V]	18	8	43
Linsen-Ausgleichsspannung [V]	5	5	10

Tabelle 11: Quellenparameter bei APCI-Ionisierung

5.4.2 LC-MS-Parameter für die Blattuntersuchungen

Es wurden dieselben HPLC-Parameter verwendet wie in Kapitel 5.4.1.

APCI und MS Einstellungen:

Alle Messungen wurden im Positiv-Ionenmodus durchgeführt.

	20	43	44
Kapillar-Temp. [°C]	150	205	150
Verdampfer-Temp. [°C]	450	430	450
Reaktandgas Flussrate [rel.]	20	40	20
Hilfsgas Flussrate [rel.]	8	5	8
Quellenspannung [kV]	6	6	6
Quellenstrom [µA]	5	3	5
Kapillar-Spannung [V]	38	6	3
Linsen-Ausgleichsspannung [V]	-10	0	-15

Tabelle 12: Quellenparameter bei APCI-Ionisierung

5.4.3 MALDI-Matrices

Die Matrices und das Sekret wurden jeweils mit gleichem Volumen aufgetragen, da die Konzentration nicht bekannt war.

Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxymtsäure)

40 mM-Lösung: 9mg/ml in H₂O(0,1%TFA)/MeCN 3/2 (v/v)

***α**Cyano-4-Hydroxymtsäure*

48 mM-Lösung: 9mg/ml in EtOH/MeCN 1/1 (v/v)

DHB (2,5-Dihydroxy-benzoessäure)

53 mM-Lösung: 9mg/ml in H₂O/MeCN 3/7 (v/v)

Dithranol

44 mM-Lösung: 10mg/ml in CHCl_3

Silber-trifluoracetat

45 mM-Lösung: 10mg/ml in H_2O

Wird erst nach dem Trocknen der Dithranol-Lösung zugegeben.

5.5 Biologischer Teil

5.5.1 Zuchtbedingungen

Phaedon cochleariae

Die Aufzucht der Blattkäfer erfolgt ganzjährig als Laborkultur. Dazu werden die Tiere getrennt nach Imagines, Puppen, Larven und Eiern bei 17°C und einem konstanten Tag/Nachtrhythmus von 16/8h gehalten. Alle 3-4 Tage werden sie mit frischem Chinakohl gefüttert. Das Eistadium dauert etwa 7 Tage, das Larvenstadium etwa drei Wochen.

Gastrophysa viridula

Die Zucht gelingt zwischen April und Dezember unter denselben Bedingungen wie bei *P. cochleariae*.

Futterpflanzen: *Rumex*-Arten (*Rumex acetosa*, *Rumex obtusifolia*)

Fundort: Jena (Zeiss-Werke)

Chrysomela populi, *Phratora vitellinae*, *Phratora laticolis*

Die Zucht der Larven erfolgt in Brüssel bei Prof. Pasteels. Die frischen Eier werden auf dem Postweg zugestellt, und die Larven werden nach dem Schlüpfen unter den gleichen Bedingungen gehalten wie oben. Fütterung erfolgt alle zwei Tage.

Futterpflanzen: *Populus*-Arten (nur sehr junge Blätter) für alle Spezies

Salix-Arten für *P. vitellinae*, *P. laticolis*

Fundort: Brüssel

5.5.2 Vermessung der Kopfkapselbreite

Insgesamt wurden 275 Larven aus allen Altersstufen verwendet. Sie wurden vor der Messung getötet, indem sie 10 min bei -20°C eingefroren werden. Dann wurde mit Hilfe eines Messokulars unter dem Stereomikroskop die Breite der Kopfkapseln vermessen.

5.5.3 Applikation der Phenole und phenolischen Glucoside

Chinakohl- und Ampferblätter mit einer Größe von etwa 30 cm^2 wurden von beiden Seiten mit 0,4 ml einer 0,1 %igen wässrigen Substratlösung bestrichen. Nachdem diese getrocknet waren, wurden jeweils sechs Larven aufgesetzt, die etwa zehn Tage alt waren. Nach drei Tagen wurde ihr Sekret mit einer Kerbspritze abgenommen, indem es von den ausgestülpten Reservoirs abgestrichen wurde. Dann wurde es mittels GC-MS analysiert.

5.5.4 Bestimmung der Chrysomelidial- und Glucose-Konzentration

Das Sekret von 6 Larven wird gesammelt, indem den Larven mehrfach mit einem Filterpapier über den Rücken gestrichen wird. Die Menge des Sekrets wird durch Differenzwägung bestimmt. Anschließend wird es in einem Zweiphasengemisch aus 50 μl Wasser und 50 μl einer 1,5 mM Lösung von Citronellal in Tetrachlorkohlenstoff extrahiert. 1 μl der organischen Phase wird abgenommen und im GC-MS vermessen. Der Gehalt von Chrysomelidial wird aus dem Integralverhältnis Citronellal/Chrysomelidial bestimmt.

10 μl der wässrigen Phase werden mit 0,5 ml eines Enzymassays (SIGMA, Glucose HK) gemischt. Nach 10 min. wird die UV-Absorption bei 340 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve kann daraus die Konzentration errechnet werden.

5.5.5 Applikation der Thioglucoside

Von den Thioglucosiden wurden 26 mM Lösungen angesetzt. Dann wurden jeweils 25 cm^2 große Chinakohl- oder Ampferblattstücke von beiden Seiten mit 0,5 ml Lösung bestrichen ($0,5\text{ }\mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Da Pappelblätter kleiner sind, wurden sie mit entsprechend weniger Lösung bestrichen.

Qualitative Gehaltbestimmung von Sekret und Hämolymphe:

Auf die vorbereiteten Blätter wurden sechs bis acht Larven gesetzt. Um das Austrocknen der Blätter zu verhindern, wurden feuchte Tücher mit in die Fraßkisten gelegt.

Nach einer Fraßperiode von zwei Tagen, wurde das Sekret der Larven in einer Kapillare gesammelt. Dabei wurde darauf geachtet, nur Sekret zu sammeln, das keinen Kontakt mit dem Rücken der Larve hatte, um Kontaminationen zu vermeiden.

Um die Hämolymphe sammeln zu können, wurden die Larven durch Einfrieren bei -20°C getötet. Sie wurden dreifach in Wasser gewaschen, um Kontaminationen zu vermeiden. Dann wurde ihnen ein Bein abgeschnitten und die austretende Hämolymphe in einer Kapillare gesammelt. Es wurde jeweils die Hämolymphe von 2 Larven vereinigt.

Die so gewonnen Proben wurden in $40\ \mu\text{l H}_2\text{O/MeOH (1:1)}$ aufgenommen und 10 min bei 4°C und 10600g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und per LC-MS analysiert.

Quantitative Gehaltbestimmung von Sekret und Hämolymphe:

Es wurden jeweils sechs Larven auf die vorbereiteten Blattstücke gesetzt. Sie wurden dann 3,6,9,12,15 oder 24 h auf den Blättern fressen gelassen. Dann wurden Sekret und Hämolymphe wie oben beschrieben abgenommen und vermessen.

Die Menge des Sekrets wurde durch Differenzmessung der Kapillaren bestimmt. Sie wurden vorher und nachher je dreifach gewogen und jeweils der Mittelwert gebildet, um Messfehler zu minimieren.

5.5.6 Extraktion der Blatthaltsstoffe

Zwei bis drei Gramm der jeweiligen Blätter wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und zermörsert. Dann wurden sie eine Stunde lang mit 150 ml MeOH extrahiert und anschließend abfiltriert. Methanol wurde im Vakuum abgezogen und ein grüner fester Rückstand blieb. Dieser wurde zweimal mit 50 ml Diethylether gewaschen, um die lipophilen Bestandteile herauszulösen. Dabei blieb ein weißer Feststoff zurück. Der wurde in $5\ \text{ml H}_2\text{O/MeOH}$ aufgenommen

und per LC-MS analysiert.

5.5.7 Silylierung und Methylierung des Wehrsekrets von *P. cochleariae*

Silylierung

Als Lösemittel für die Silylierung diente ein Gemisch von Pyridin/Acetonitril 2:8.

Sekret von 10 Larven (~350 ng) wurde abgenommen und in einem GC-Vial mit 100 µl Lösemittel und 400 µl MSTFA gemischt. Danach wurde es für eine Stunde im Heizblock auf 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde es per GC-MS analysiert.

Methylierung

Das Sekret von 10 Larven wurde in GC-Vial gegeben und mit 100 µl Diazomethan versetzt.

Nach 10 min wurde das Diazomethan im Argonstrom abgeblasen, der Rückstand in 100 µl Diethylether aufgenommen und per GC-MS vermessen.

Methylierung mit anschließender Silylierung

Sekret von 10 Larven wird wie oben beschrieben methyliert. Nach dem Verdampfen des überschüssigen Diazomethans wird der Rückstand wie oben beschrieben silyliert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Gullan PJ. *Insects: An Outline of Entomology*: Chapman & Hall; **1994**.
2. Duffey S, Scudder GCE. *Cardiac Glycosides in North American Asclepiadaceae, a Chemical Basis for Unpalatability in Brightly Coloured Hemiptera and Coleoptera*. J. Insect Physiol. **1972**; 18:63-78.
3. Rothschild M, von Euw J, Reichstein T. *Cardiac Glycosides in the Oleander Aphid Aphis nerii*. J. Insect Physiol. **1972**; 16:1141-1145.
4. von Euw J, Fishelson L, Parsons JA, Reichstein T, Rothschild M. *Cardenolides (Heart Poisons) in a Grasshopper Feeding on Milkweeds*. Nature **1967**; 214(5083):35.
5. Duffey S. *Cardiac Glycosides and Distastefulness: Some Observations on the Palatability Spectrum of Butterflies*. Science **1970**; 169:78-79.
6. Bowers MD, Farley S. *The Behavior of Gray Jays Perisoreus canadensis towards Palatable and Unpalatable Lepidoptera*. Anim. Behav. **1990**; 39(4):699-705.
7. Camara MD. *Predator Responses to Sequestered Plant Toxins in Buckeye Caterpillars: Are Tritrophic Interactions Locally Variable?* J. Chem. Ecol. **1997**; 23(9):2093-2106.
8. Theodoratus DH, Bowers MD. *Effects of Sequestered Iridoid Glycosides on Prey Choice of the Prairie Wolfe Spider Lycosa carolinensis*. J. Chem. Ecol. **1999**; 25(2):283-295.
9. Rothschild M, von Euw J, Reichstein T. *Aristolochic Acids Stored by Zerynthia polyxena (Lepidoptera)*. Insect Biochem. **1972**; 2(7):334.
10. Aplin RT, Darcyward R, Rothschild M. *Examination of Large White and Small White Butterflies (Pieris Spp) for Presence of Mustard Oils and Mustard Oil Glycosides*. J. Ent. (A) **1975**; 50(2):73-78.
11. Schulz S, Francke W, Boppre M, Eisner T, Meinwald J. *Insect pheromone Biosynthesis: Stereochemical Pathway of Hydroxydanaidal Production from Alkaloidal Precursors in Creatonotos transiens (Lepidoptera, Arctiidae)*. P. Natl. Acad. Sci. USA **1993**; 90(14):6834-6838.
12. Brown KS, Jr. *Chemical Ecology of Dehydropyrrolizidine Alkaloids in Adult Ithomiinae Lepidoptera Nymphalidae*. Rev. Bras. Biol. **1985**; 44(4):435-460.
13. Dussourd DE, Ubik K, Harvis C, Resch J, Meinwald J, Eisner T. *Biparental Defensive Endowment of Eggs with Acquired Plant Alkaloid in the Moth Utetheisa ornatatrix*. P. Natl. Acad. Sci. USA **1988**; 85(16):5992-5996.
14. Ehmke A, Rowell-Rahier M, Pasteels JM, Hartmann T. *Sequestration of Ingested [C-14] Senecionine N-Oxide in the Exocrine Defensive Secretions of Chrysomelid Beetles*. J. Chem. Ecol. **1991**; 17(12):2367-2379.
15. Ehmke A, Rahier M, Pasteels JM, Theuring C, Hartmann T. *Sequestration,*

- Maintenance, and Tissue Distribution of Pyrrolizidine Alkaloid N-Oxides in Larvae of Two Oreina species.* J. Chem. Ecol. **1999**; 25(10):2385-2395.
16. Biller A, Boppre M, Witte L, Hartmann T. *Pyrrolizidine Alkaloids in Chromolaena odorata: Chemical and Chemoecological Aspects.* Phytochemistry (Oxford) **1994**; 35(3):615-619.
 17. Hartmann T, Witte L. *Pyrrolizidine Alkaloids: Chemical, Biological and Chemoecological Aspects.* In: Pelletier S, editor. *Alkaloids: chemical and biological perspectives.* Volume 9. Oxford: Pergamon Press; **1995**:155-233.
 18. *Römpp Lexikon Naturstoffe.* Steglich W, Fugmann B, Lang-Fugmann S, editors. Stuttgart, New York: Thieme; **1997**.
 19. Hartmann T. *Chemical Ecology of Pyrrolizidine Alkaloids.* Planta **1999**; 207(4):483-495.
 20. Hartmann T, Ehmke A, Eilert U, von Borstel K, Theuring C. *Sites of Synthesis, Translocation and Accumulation of Pyrrolizidine Alkaloid N-Oxides in Senecio vulgaris.* Planta **1989**; 177:98-107.
 21. Mattocks A. *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids.* London: Academic Press; **1986**.
 22. Cheeke P. *A Review of the Functional and Evolutionary Roles of the Liver in Detoxification of Poisonous Plants, with Special Reference to Pyrrolizidine Alkaloids.* Vet. Hum. Toxicol. **1994**; 36:240-247.
 23. Hartmann T, Theuring C, Schmidt J, Rahier M, Pasteels JM. *Biochemical Strategy of Sequestration of Pyrrolizidine Alkaloids by Adults and Larvae of Chrysomelid Leaf Beetles.* J. Insect Physiol. **1999**; 45(12):1085-1095.
 24. Rowell-Rahier M, Pasteels JM. *Economics of Chemical Defense in Chrysomelinae.* J. Chem. Ecol. **1986**; 12(5):1189-1203.
 25. Kearsley MJC, Whitham TG. *Guns and Butter: A No Cost Defense Against Predation for Chrysomela confluenta.* Oecologia **1992**; 92(4):556-562.
 26. Denno RF, Larsson S, Olmstead KL. *Role of Enemy-Free Space and Plant Quality in Host-Plant Selection by Willow Beetles.* Ecology **1990**; 71(1):124-137.
 27. Schöller M. *Ökologie Mitteleuropäischer Blattkäfer, Samenkäfer und Breitwürmer:* Erster Vorarlberger Coleopterolog. Ver.; **1998**.
 28. Santiago-Blay JA. *Paleontology of Leaf Beetles.* In: Jolivet PH, Cox ML, Petitpierre E, editors. *Novel Aspects of the Biology of Chrysomelidae, Series Entomologica (Vol. 50).* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; **1994**:1-68.
 29. Seeno TN, Wilcox JA. *Leaf Beetle Genera (Coleoptera: Chrysomelidae).* Entomography **1982**; 1:1-221.
 30. Garb G. *The Eversible Glands of a Chrysomelid Larva, Melasoma lapponica.* J. Entomol. Zool. **1915**; 8:88-97.
 31. Hilker M. *Chemische Ökologie juveniler Entwicklungsstadien der Blattkäfer*

(Coleoptera, Chrysomelidae). Bayreuth: BITÖK; **1993**.

32. Blum MS. *Antipredator Devices in Larvae of the Chrysomelidae: a Unified Synthesis for Defensive Electicism*. In: Jolivet PH, Cox ML, Petitpierre E, editors. *Novel Aspects of the Biology of Chrysomelidae, Series Entomologica (Vol. 50)*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; **1994**:277-288.
33. Gross J, Muller C, Vilcinskas A, Hilker M. *Antimicrobial Activity of Exocrine Glandular Secretions, Hemolymph, and Larval Regurgitate of the Mustard Leaf Beetle *Phaedon Cochleariae**. J. Invertebr. Pathol. **1998**; 72(3):296-303.
34. Pasteels JM, Braekman JC, Daloze D. *Chemical Defense in Chrysomelidae*. In: Jolivet PH, Petitpierre E, Hsiao TH, editors. *Biology of Chrysomelidae*. Volume 42, *Entomologica Ser.* Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers; **1988**:233-252.
35. Thieme H. *Isolierung eines neuen Phenolglucosids aus *Salix Purpurea* L.* Pharmazie **1964**; 19(11):725.
36. Pearl IA, Darling SF. *Studies on Leaves of Family Salicacear. 16. Phenolic Extractives of Leaves of *Populus balsamifera* and of *P. trichocarpa**. Phytochemistry **1971**; 10(11):2844.
37. Termonia A, Pasteels JM. *Larval Chemical Defence and Evolution of Host Shifts in *Chrysomela* Leaf Beetles*. Chemoecology **1999**; 9:13-23.
38. Termonia A, Hsiao TH, Pasteels JM, Milinkovitch MC. *Feeding Specialization and Host-Derived Defense in Chrysomeline Leaf Beetles Did Not Lead to an Evolutionary Dead End*. P. Natl. Acad. Sci. USA **2001**; 98(7):3909-3914.
39. Daloze D, Pasteels JM. *Isolation of 8-Hydroxygeraniol-8-O-**β**-D-Glucoside, a Probable Intermediate in Biosynthesis of Iridoid Monoterpenes, from Defensive Secretions of *Plagioderma versicolora* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera, Chrysomelidae)*. J. Chem. Ecol. **1994**; 20(8):2089-2097.
40. Veith M, Lorenz M, Boland W, Simon H, Dettner K. *Biosynthesis of Iridoid Monoterpenes in Insects - Defensive Secretions from Larvae of Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae)*. Tetrahedron **1994**; 50(23):6859-6874.
41. Oldham NJ, Veith M, Boland W, Dettner K. *Iridoid Monoterpene Biosynthesis in Insects - Evidence for a de novo Pathway Occurring in the Defensive Glands of *Phaedon armoraciae* (Chrysomelidae) Leaf Beetle Larvae*. Naturwissenschaften **1996**; 83(10):470-473.
42. Schreiber SL, Mezers HV, Wiberg KB. *Stereochemistry of the Intramolecular Enamine/Enal (enone) Cycloaddition Reaction and Subsequent Transformations*. J. Am. Chem. Soc. **1986**; 108:8274-8277.
43. Unelius CR, Norin T. *A Short Synthesis of Gistolactone*. Natural Product Letters **1994**; 5:61-68.
44. Weibel DB, Oldham NJ, Feld BK, Glombitza G, Dettner K, Boland W. *Iridoid Biosynthesis in Staphylinid Rove Beetles (Coleoptera: Staphylinidae, Philonthinae)*. Insect Biochem. **2001**; 31:583-591.

45. Lorenz M, Boland W, Dettner K. *Biosynthesis of Iridodials in the Defense Glands of Beetle Larvae (Chrysomelinae)*. Angew. Chem. Int. Edit. **1993**; 32(6):912-914.
46. Pasteels JM, Rowell-Rahier M, Braekman JC, Dupont A. *Salicin from Host Plant as Precursor of Salicylaldehyde in Defensive Secretion of Chrysomeline Larvae*. Physiol. Entomol. **1983**; 8(3):307-314.
47. Pasteels JM, Duffey S, Rowell-Rahier M. *Toxins in Chrysomelid Beetles - Possible Evolutionary Sequence from de novo Synthesis to Derivation from Food-Plant Chemicals*. J. Chem. Ecol. **1990**; 16(1):211-222.
48. Veith M, Oldham NJ, Dettner K, Pasteels JM, Boland W. *Biosynthesis of Defensive Allomones in Leaf Beetle Larvae: Stereochemistry of Salicylalcohol Oxidation in Phratora vitellinae and Comparison of Enzyme Substrate and Stereospecificity with Alcohol Oxidases from Several Iridoid Producing Leaf Beetles*. J. Chem. Ecol. **1997**; 23(2):429-443.
49. Pasteels JM, Braekman JC, Daloze D, Ottinger R. *Chemical Defense in Chrysomelid Larvae and Adults*. Tetrahedron **1982**; 38(13):1891-1897.
50. Feld BK. *Zur Bedeutung von glycosidisch gebundenen Phenolen als Vorstufen für Wehrsubstanzen bei Blattkäferlarven* [Diplomarbeit]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität; **1997**.
51. Pasteels JM, Gregoire JC. *Selective Predation on Chemically Defended Chrysomelid Larvae - a Conditioning Process*. J. Chem. Ecol. **1984**; 10(12):1693-1700.
52. Soetens P, Pasteels JM, Daloze D. *A Simple Method for in vivo Testing of Glandular Enzymatic Activity on Potential Precursors of Larval Defensive Compounds in Phratora Species (Coleoptera, Chrysomelinae)*. Experientia **1993**; 49(11):1024-1026.
53. Daly HV. *Insect Morphometrics*. Annu. Rev. Entomol. **1985**; 30:415-438.
54. Chapman RF. *The Insects: Structure & Function*. [Illustrated]: Cambridge University Press; **1998**.
55. Fenwick GR, Heaney RK, Mullin WJ. *Glucosinolates and Their Breakdown Products in Food and Foodplants*. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **1983**; 18:123-201.
56. Nicotra F. *Modified Carbohydrates and Carbohydrate Analogues*. In: Boons G-J, editor. *Carbohydrate Chemistry*: Blackie Academic & Professional; **1998**:384-429.
57. Fairweather JK, Driguez H. *Synthesis of Oligosaccharide Mimics: S-Analogs*. In: Ernst B, Sinay P, Hart G, editors. *Carbohydrates in Chemistry and Biology: a Comprehensive Handbook*. Volume 1: Wiley-VCH; **2000**:531-565.
58. Ueno K. *Structure of Salicin, C₁₃H₁₈O₇*. Acta Crystallogr. C. **1984**; 40(OCT):1726-1728.
59. Brückner R. *Reaktionsmechanismen. Organische Reaktionen, Stereochemie*,

moderne Synthesemethoden: Spektrum; **1996**.

60. Agilent-Homepage. *Brochure for LC/MSD*.
61. Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. New York: Georg Thieme Verlag; **1991**.
62. Finnigan M. *Manual of Finnigan LCQ*. Bremen.
63. Kompants V, Shinkare A. *Phenolic Glycosides of Salix pentandroides Roots*. Khim. Prir. Soedin. **1973**; (1):126-126.
64. Jossang A, Jossang P, Bodo B. *Cinnamrutinose-A and Cinnamrutinose-B, Glycosides of Populus tremula*. Phytochemistry **1994**; 35(2):547-549.
65. Yoshizawa F, Deyama T, Takizawa N, Usmanghani K, Ahmad M. *The Constituents of Cistanche tubulosa (Schrenk) Hook F. 2. Isolation and Structures of a new Phenylethanoid Glycoside and a new Neolignan Glycoside*. Chem. Pharm. Bull. **1990**; 38(7):1927-1930.
66. Straubinger M, Knapp H, Oka N, Watanabe N, Winterhalter P. *Isolation of a Glucosidic **b**-Damascenone Precursor from Rose Petals*. J. Agric. Food Chem. **1997**; 45(10):4053-4056.
67. Sekiwa Y, Mizuno Y, Yamamoto Y, Kubota K, Kobayashi A, Koshino H. *Isolation of Some Glucosides as Aroma Precursors from Ginger*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **1999**; 63(2):384-389.
68. Dettner K. *Comparative Investigations on Defensive Chemistry and Gland Morphology of Abdominal Defensive Glands from Rove Beetles of the Subtribe Philonthina (Coleoptera, Staphylinidae)*. Z. Naturforsch., C: Biosci. **1983**; 38(3-4):319-328.
69. Huth A, Dettner K. *Defense Chemicals from Abdominal Glands of 13 Rove Beetle Species of Subtribe Staphylinina (Coleoptera, Staphylinidae, Staphylininae)*. J. Chem. Ecol. **1990**; 16(9):2691-2711.
70. Dettner K. *Defensive Secretions and Exocrine Glands in Free-Living Staphylinid Beetles - Their Bearing on Phylogeny (Coleoptera, Staphylinidae)*. Biochem. Syst. Ecol. **1993**; 21(1):143-162.
71. Johnstone RAW, Rose ME. *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*. Cambridge: University Press; **1996**.
72. Micromass. *TofSpec E & SE Operator Manual*. **1997**.
73. Schmidt RR. *New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides - Are There Alternatives to the Koenigs-Knorr Method*. Angew. Chem. Int. Edit. **1986**; 25(3):212-235.
74. Mancuso AJ, Huang SL, Swern D. *Oxidation of Long-Chain and Related Alcohols to Carbonyls by Dimethyl-Sulfoxide Activated by Oxalyl Chloride*. J. Org. Chem. **1978**; 43(12):2480-2482.
75. Appel R, Halstenberg M. *Functional Group Conversions using Phosphorous (III) Reagents and Polyhalogenoalkanes*. In: Cadogan JIG, editor.

- Organophosphorous Reagents in Organic Synthesis*. London: Academic Press; **1979**.
76. Tsvetkov YE, Byramova NE, Backinowsky LV. *A Simple Preparation of Aromatic 1-Thioglycosides*. Carbohydr. Res. **1983**; 115(APR):254-258.
77. Lehmann J. *Kohlenhydrate*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; **1996**.
78. Xiangjuna Y, Jionga L, Jinga L, Zuoshenga L, Yulina L. *An Efficient Total Synthesis of (±)-Sinulariol-B*. Tetrahedron **1999**; 55(1):133-140.
79. Falconer RA, Jablonkai I, Toth I. *Efficient Synthesis of Thioglycosides via a Mitsunobu Condensation*. Tetrahedron Lett. **1999**; 40(49):8663-8666.
80. Jux A, Gleixner G, Boland W. *Natürliche $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse erlauben die Zuordnung von Terpenen zur Methylerythritolphosphat- oder der Mevalonat-Route: Dynamische Ressourcennutzung in induzierten Pflanzen*. Angew. Chem. **2001**; in Druck.
81. Hall A, Rydon H, Hollings S. *The Acid and Alkaline Hydrolysis of Some Substituted Phenyl- α -D-Glucosides*. J. Chem. Soc. **1961**:4290.
82. Sigurskjold B, Haunstrup I, Bock K. *Hydrolysis of Substrate Analogues Catalysed by β -D-Glucosidase from Aspergillus niger. Part III. Alkyl and Aryl β -D-Glucopyranosides*. Acta Chem. Scand. **1992**; 46(5):451-458.
83. Reichel, Schickle. *Synthesen einiger Flavanonglucoside unter physiologischen Bedingungen*. Justus Liebigs Ann. Chem. **1942**; 553:98-100.
84. Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K, Kim IH. *Studies on the Constituents of Gastrodia elata Blume*. Chem. Pharm. Bull. **1981**; 29(1):55-62.
85. Brunckova J, Crich D. *Intramolecular Hydrogen Atom Abstraction*. Tetrahedron **1995**; 51(44):11945-11952.
86. Kirmse W, Kund K. *Intramolecular Generation of Oxonium Ylides from Functionalized Arylcarbenes*. J. Am. Chem. Soc. **1989**; 111(4):1465-1473.
87. Yue X, Lan J, Li J, Liu Z, Lin Y. *An Efficient Synthesis of (+/-)-Sinulariol B*. Tetrahedron **1999**; 55(1):133-140.
88. Chehade KAH, Andres DA, Morimoto H, Spielmann HP. *Design and Synthesis of a Transferable Farnesyl Pyrophosphate Analogue to Ras by Protein Farnesyltransferase*. J. Org. Chem. **2000**; 65(10):3027-3033.

7 ANHANG

7.1 IR-Spektren

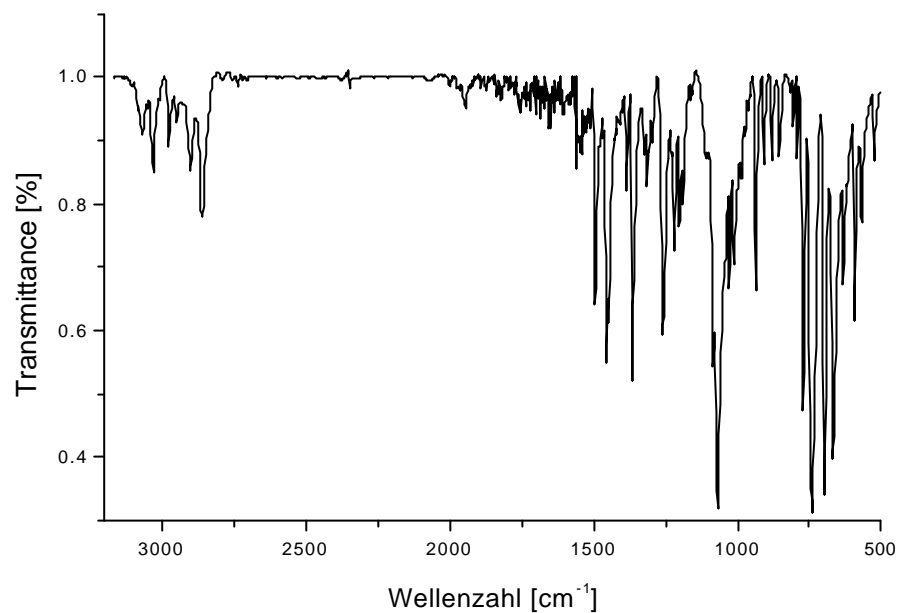


Abb. 45: 1-Chloromethyl-phenylmethoxymethyl-benzen **58**

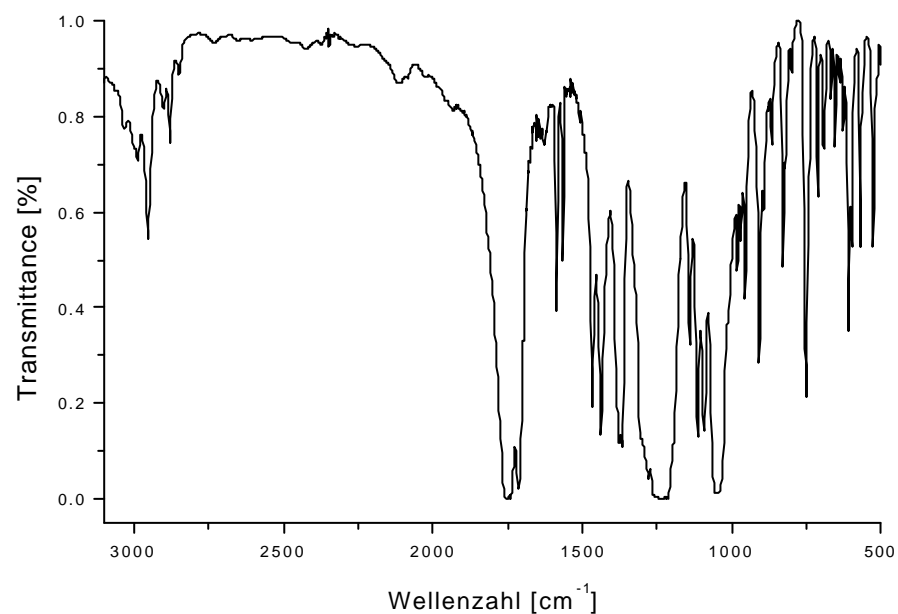


Abb. 46: 2-Methoxycarbonyl-sufanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid **63**

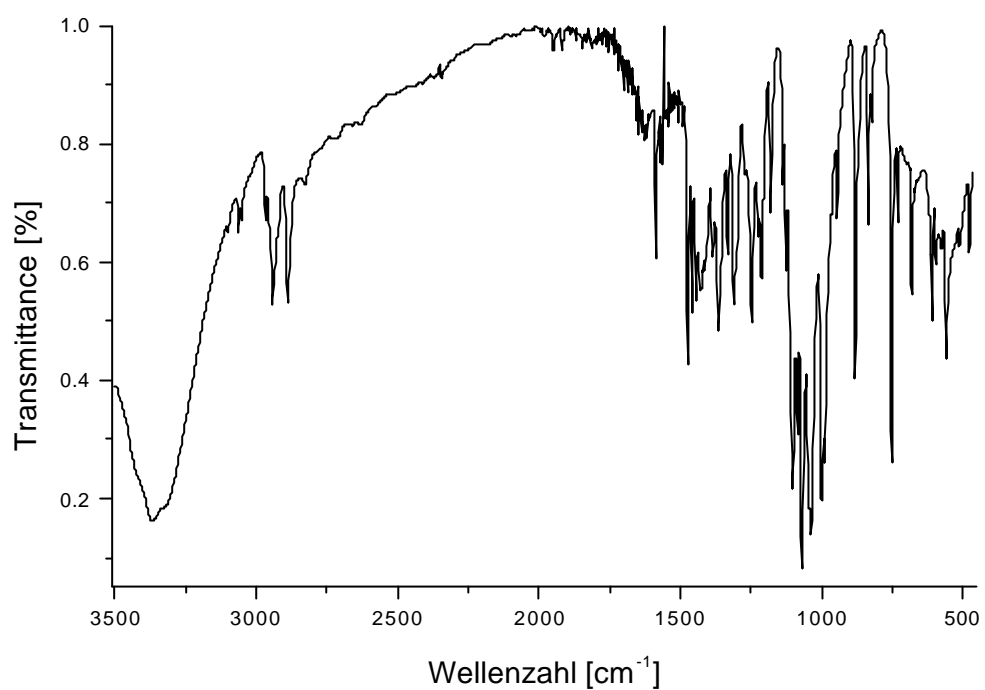


Abb. 47: 2-Hydroxymethyl-phenylsulfanyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid **38**

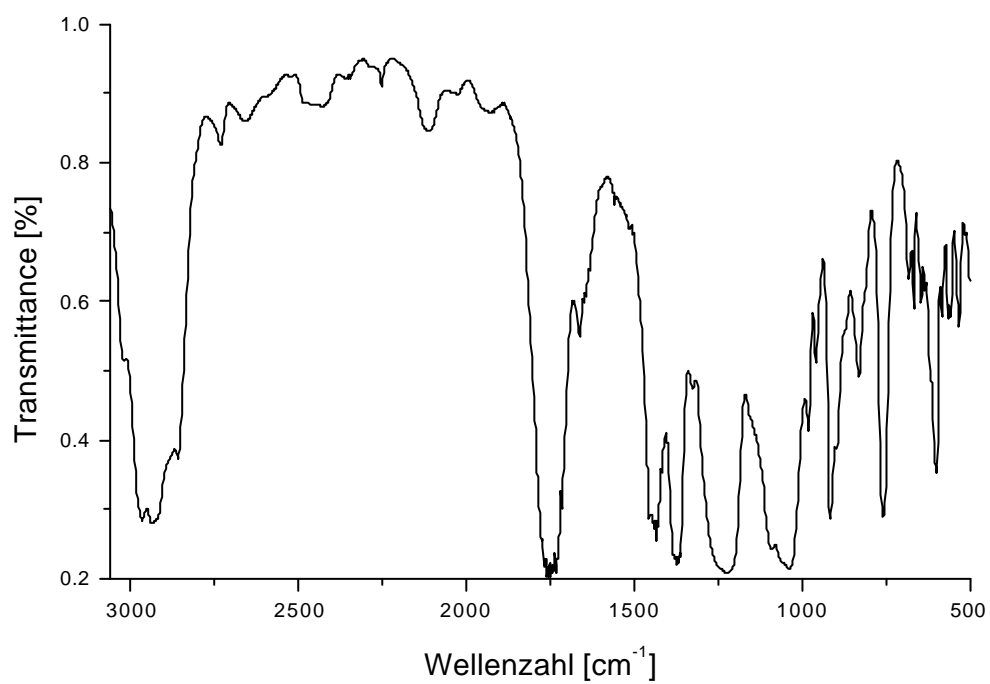


Abb. 48: 3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid **67**

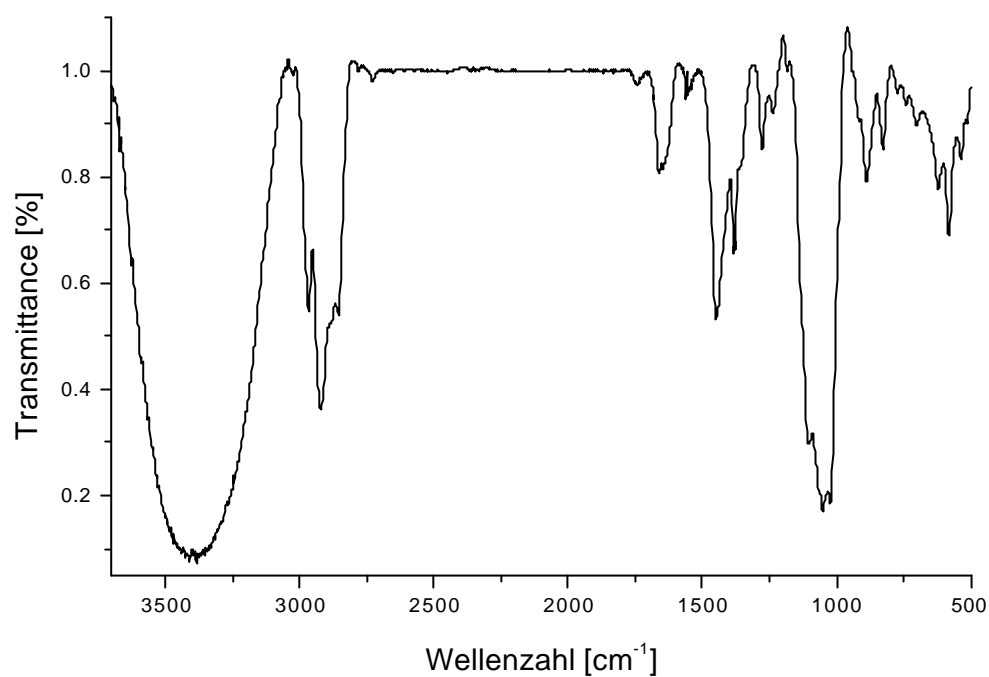


Abb. 49: 3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **39**

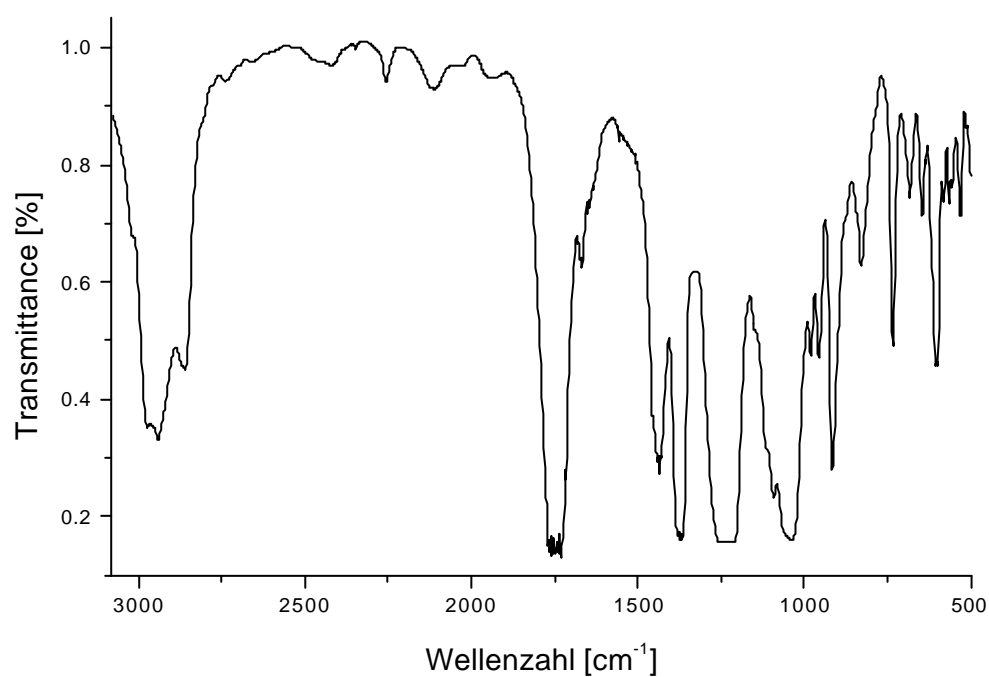


Abb. 50: 8-Acetoxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **72**

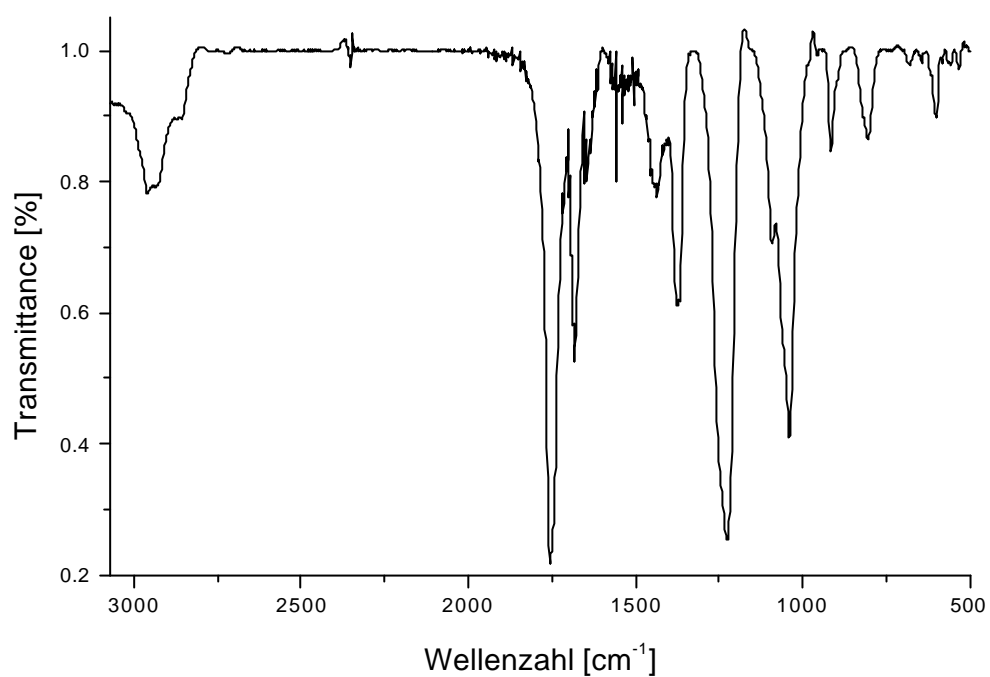


Abb. 51: 2,6-Dimethyl-8-oxo-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **73**

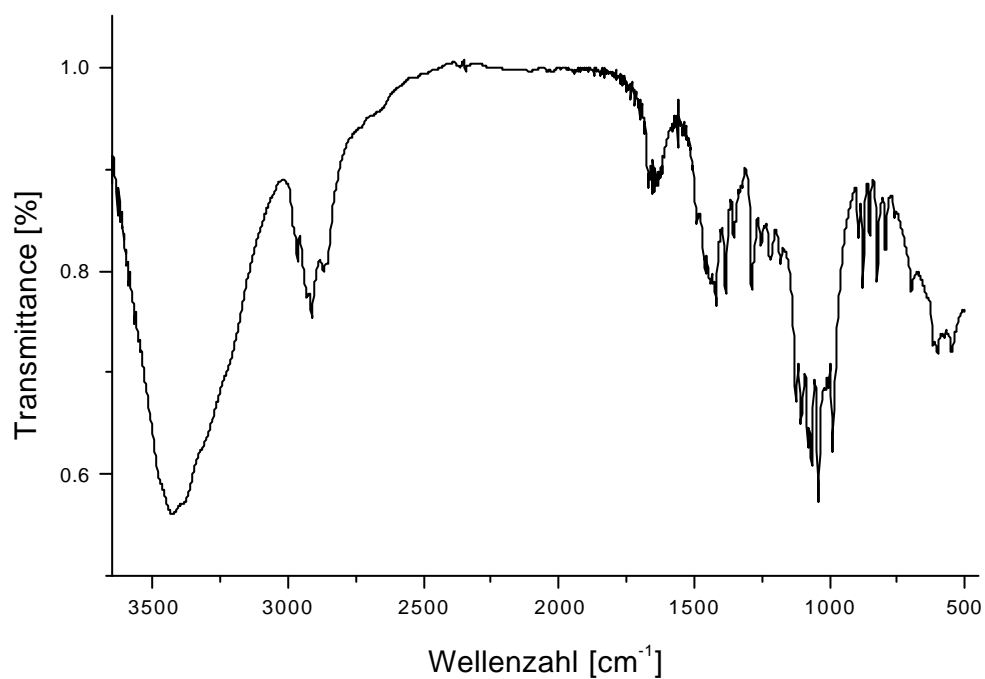


Abb. 52: 8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **40**

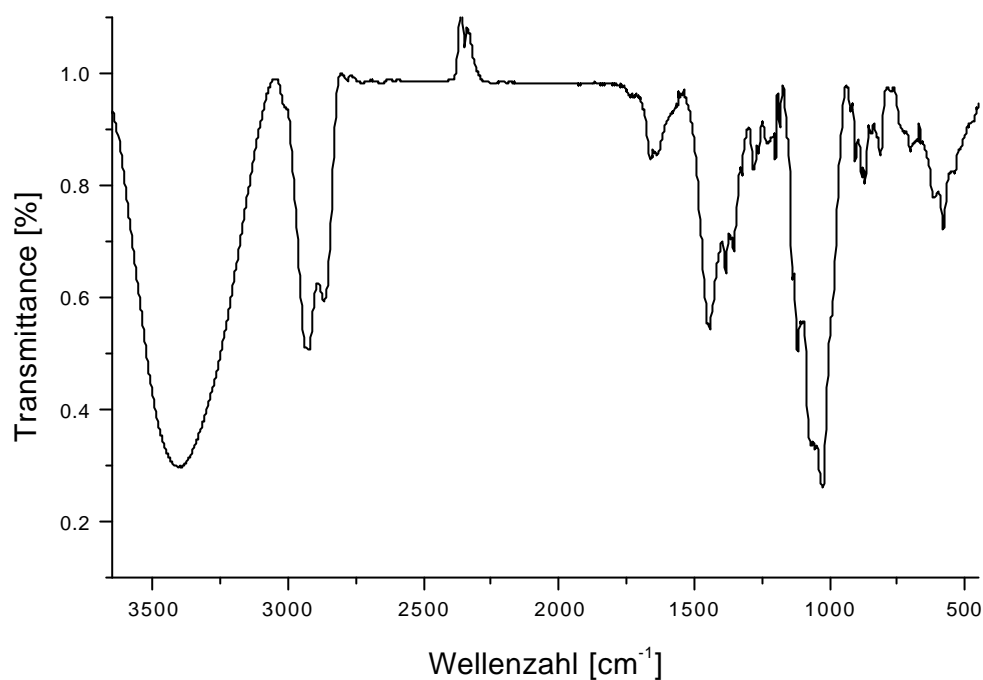


Abb. 53: 8-Hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid **41**

7.2 MS-Spektren

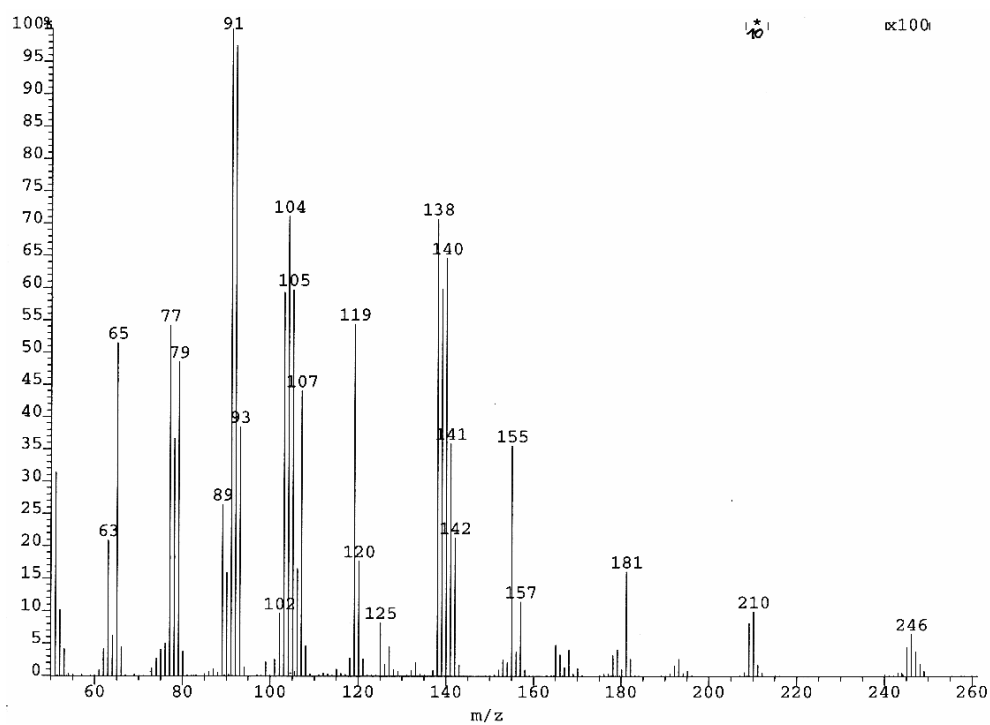


Abb. 54: 1-Chloromethyl-phenylmethoxymethyl-benzen **58**

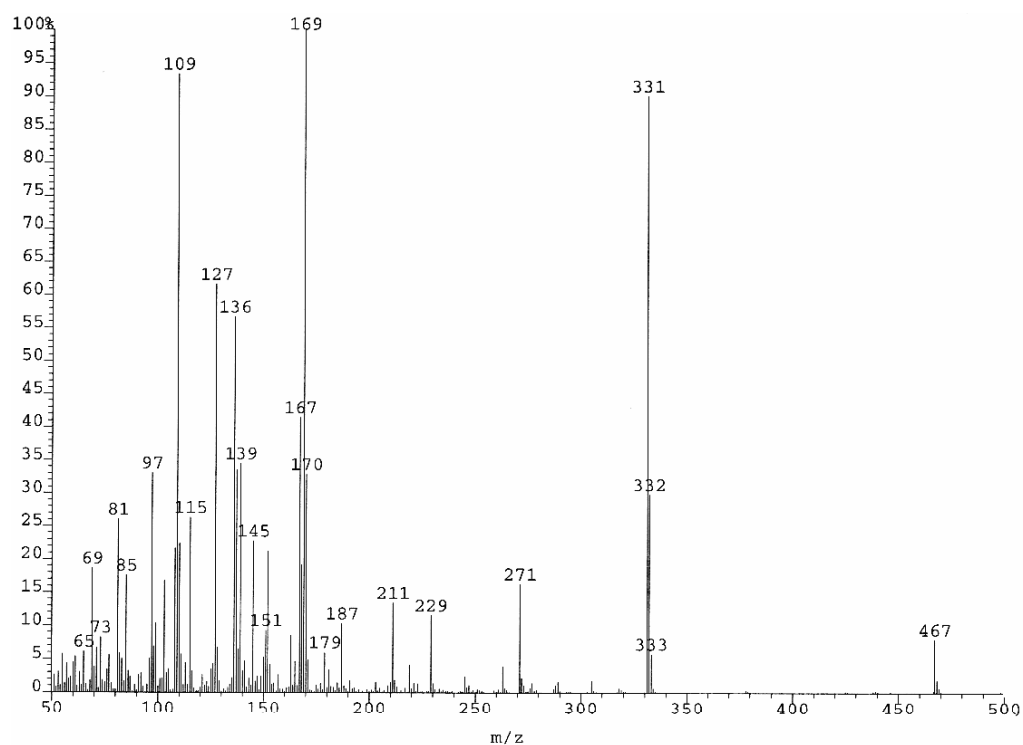


Abb. 55: 2-Methoxycarbonylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **63**

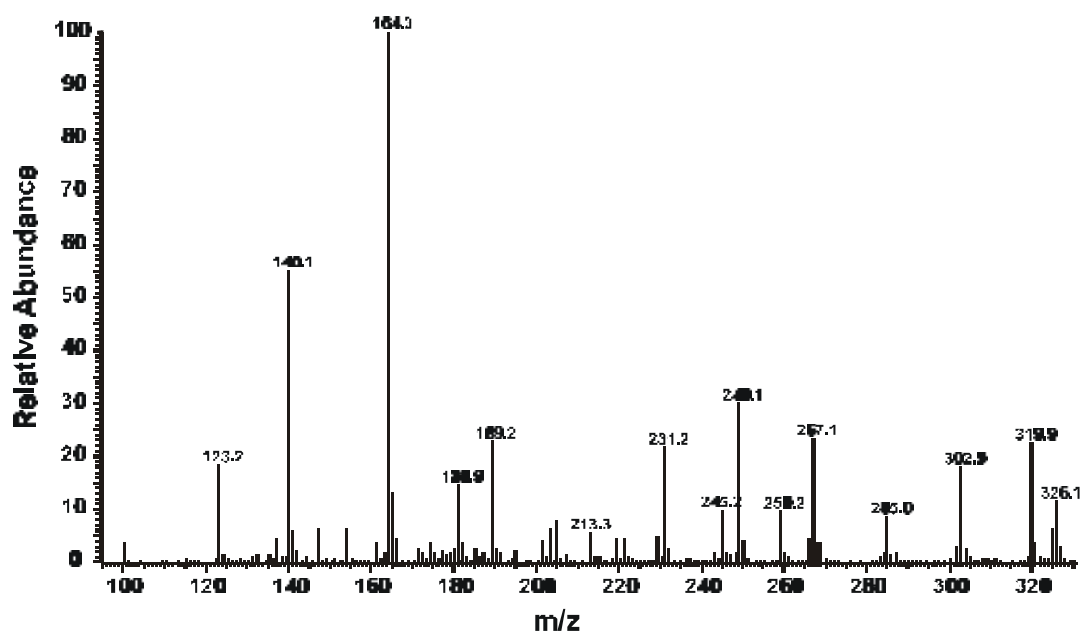


Abb. 56: 2-Hydroxymethyl-phenylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **38**

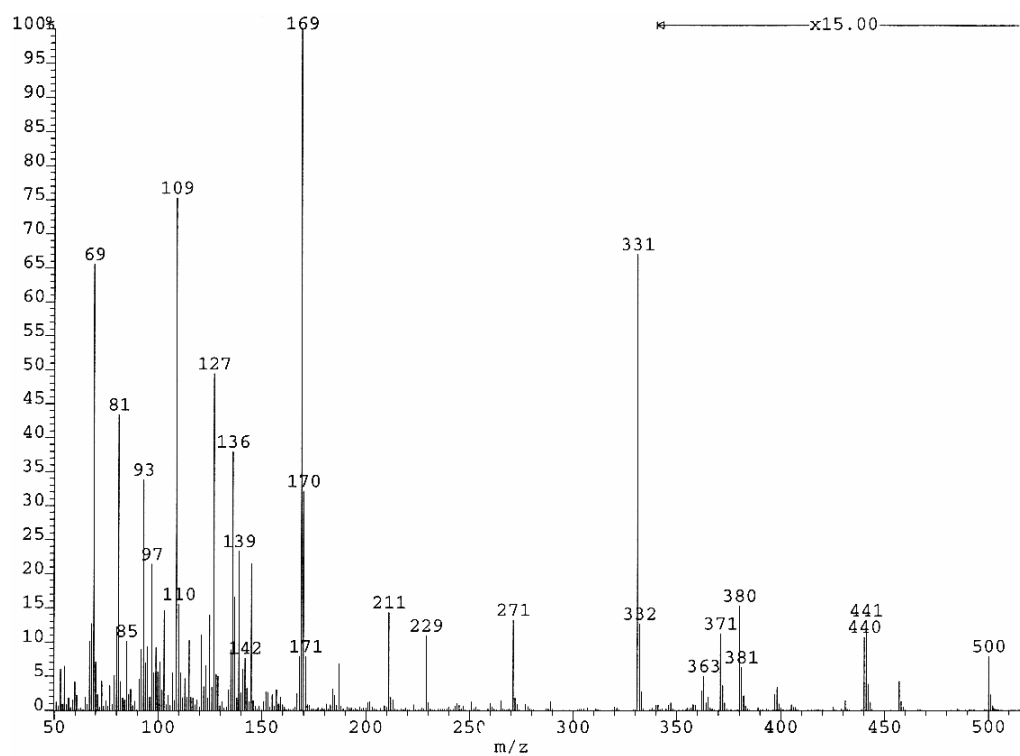


Abb. 57: 3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **67**

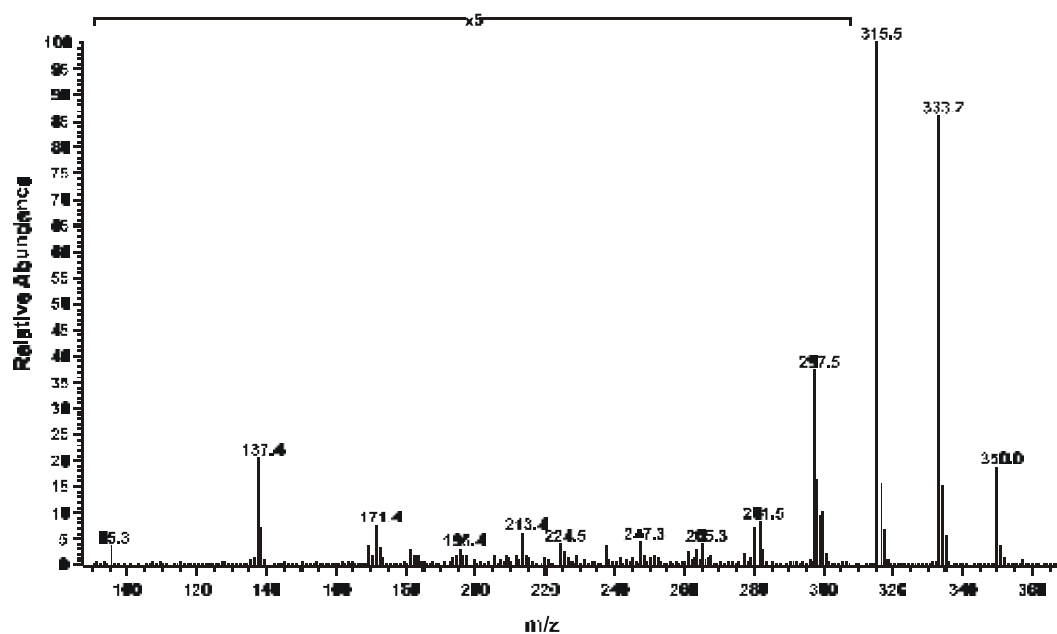


Abb. 58: 3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **39**

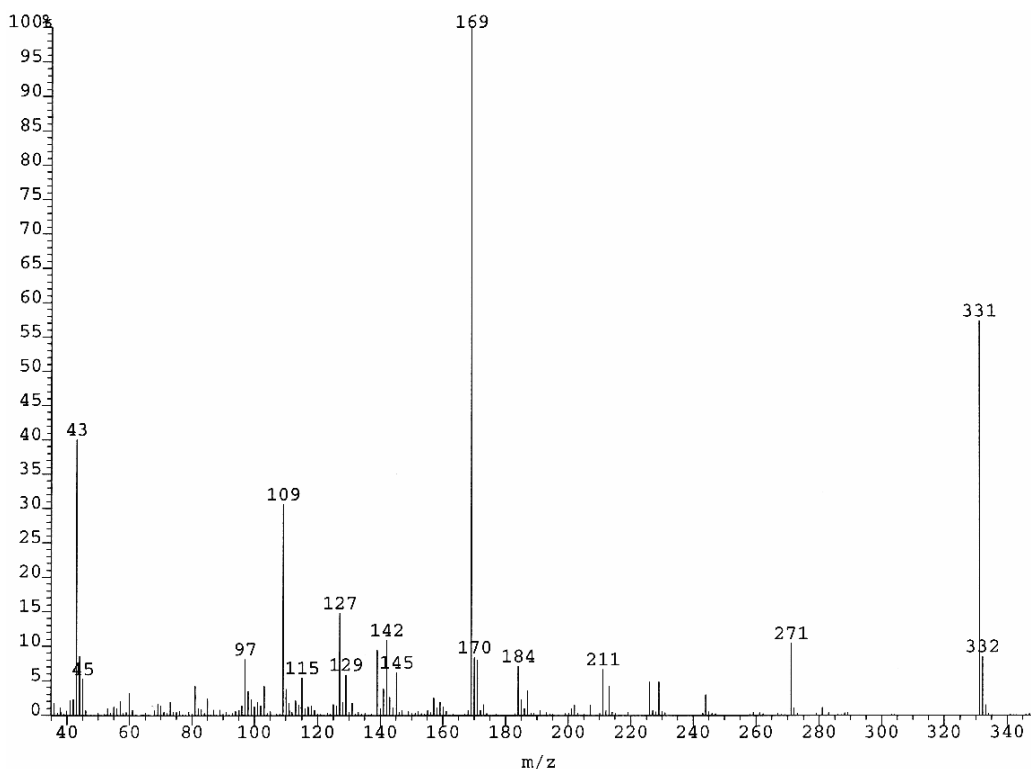


Abb. 59: 8-Acetoxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **72**

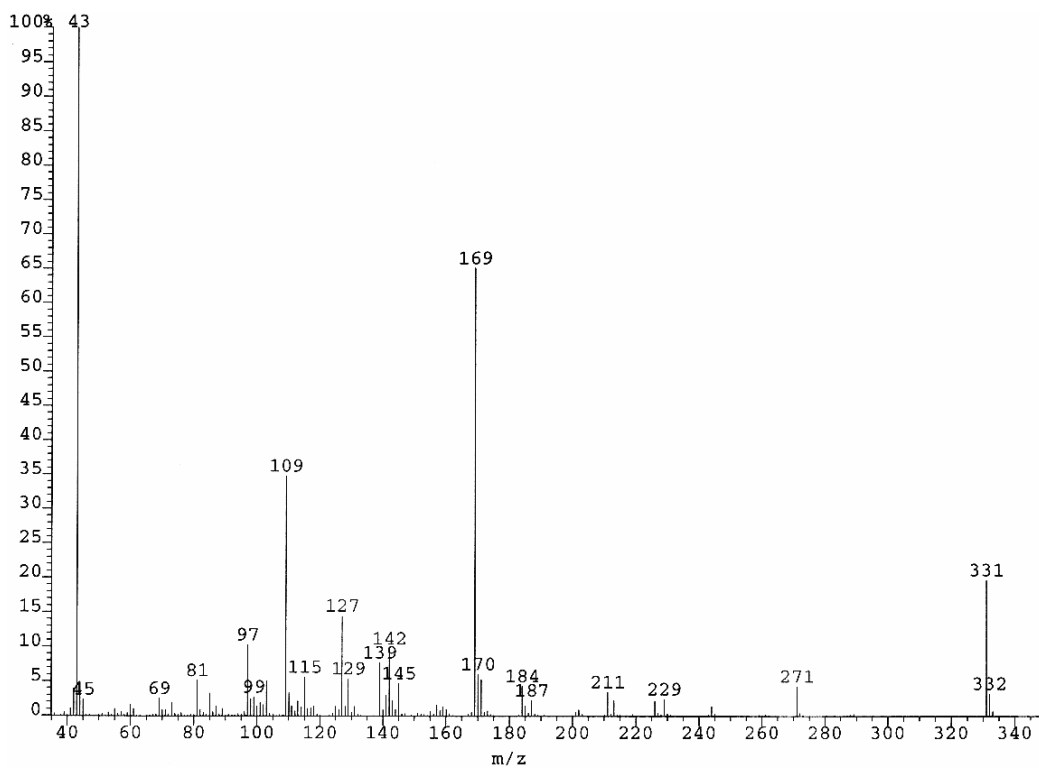


Abb. 60: 3,7-Dimethyl-8-oxo-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **73**

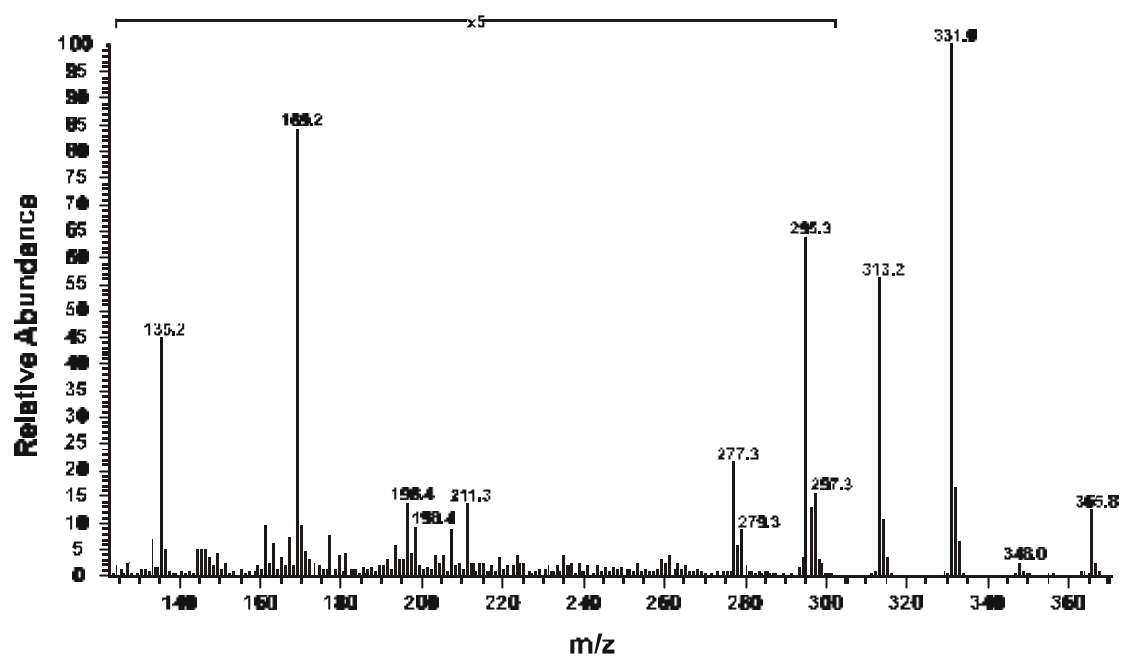


Abb. 61: 8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienysulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **40**

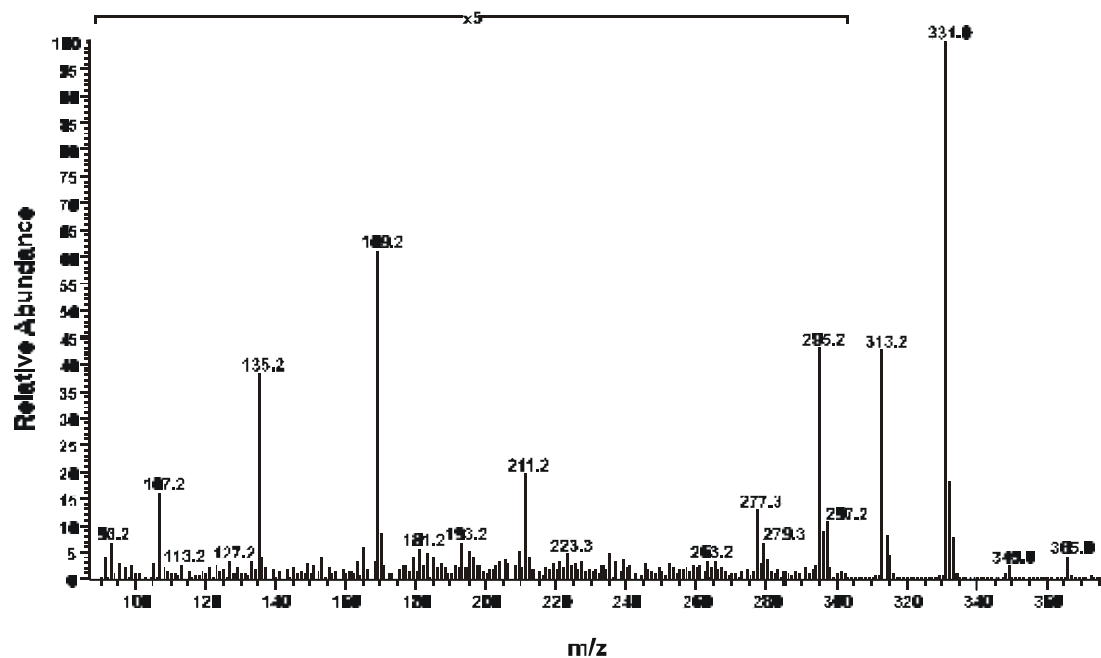


Abb. 62: 8-Hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienysulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **41**

7.3 ^1H -NMR-Spektren

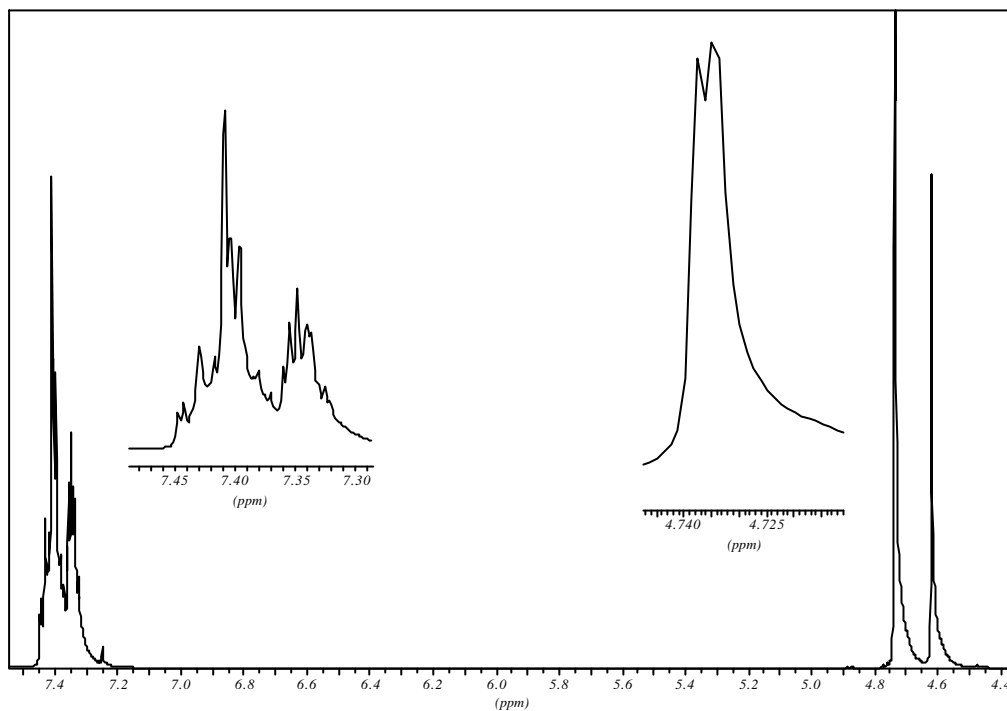


Abb. 63: 1-Chloromethyl-phenylmethoxymethyl-benzen **58**

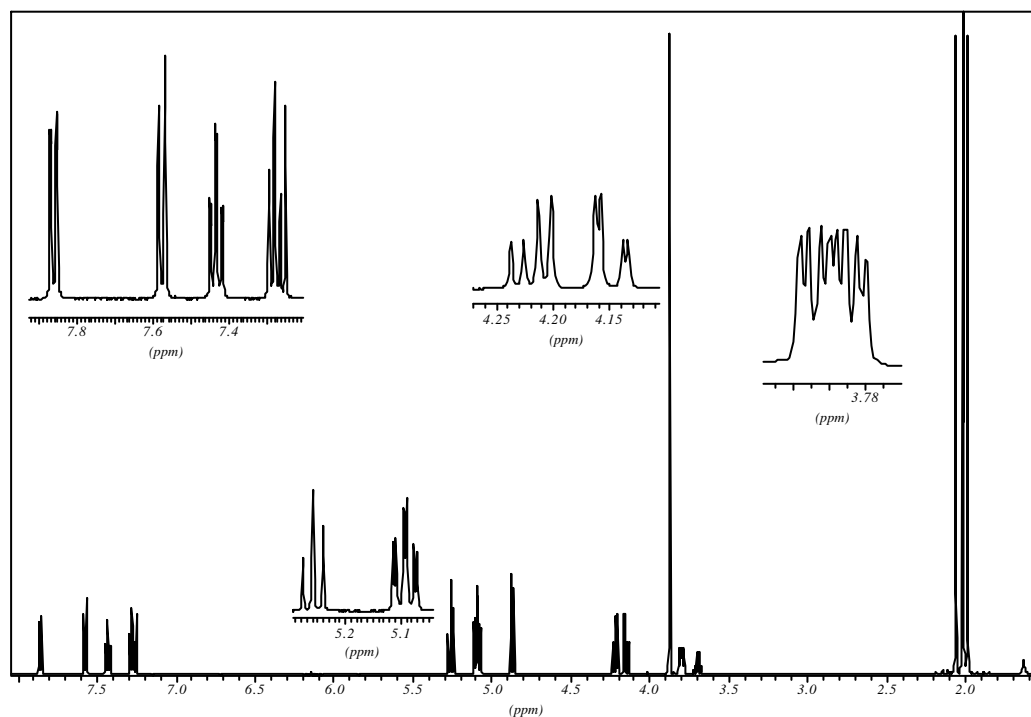


Abb. 64: 2-Methoxycarbonyl-phenylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **63**

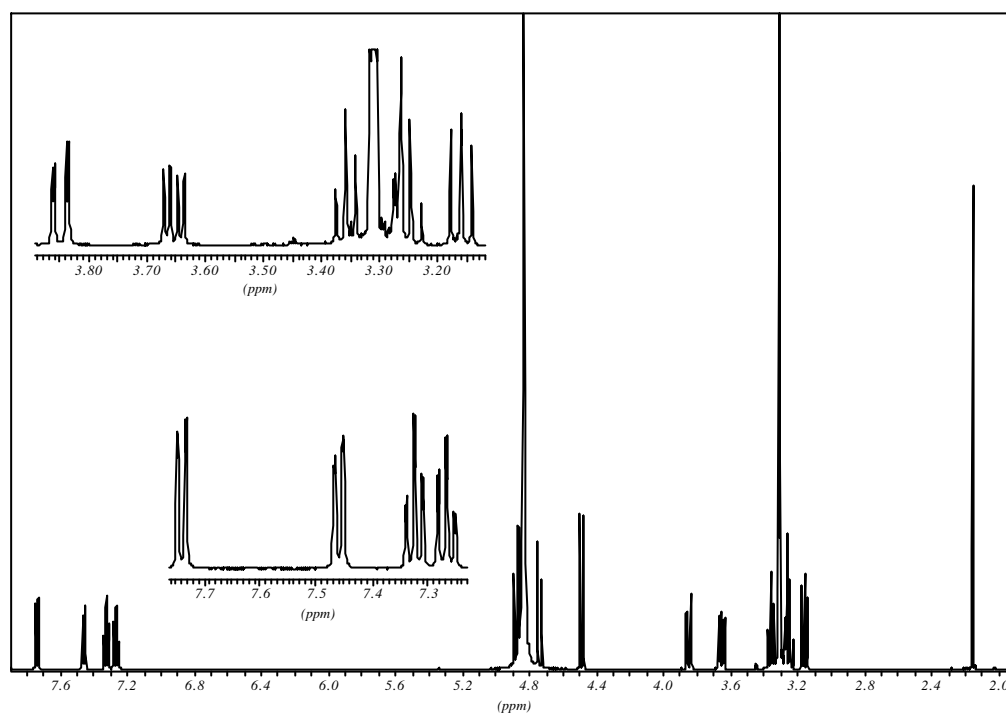


Abb. 65: 2-Hydroxymethyl-phenylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **38**

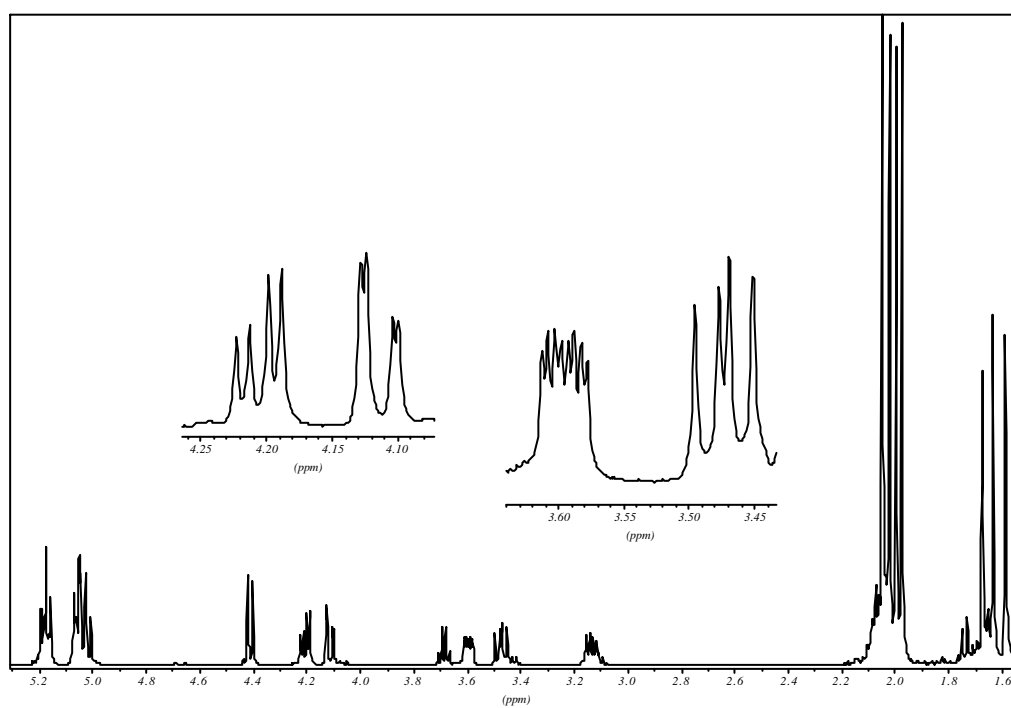


Abb. 66: 3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-Tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **67**

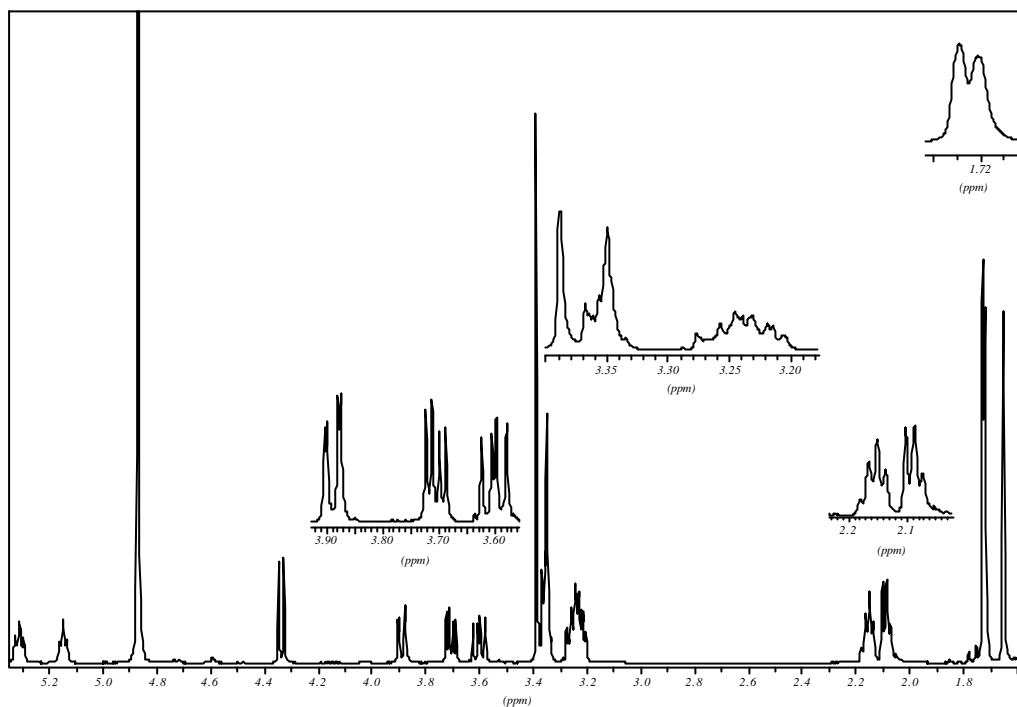


Abb. 67: 3,7-Dimethyl-octa-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **39**

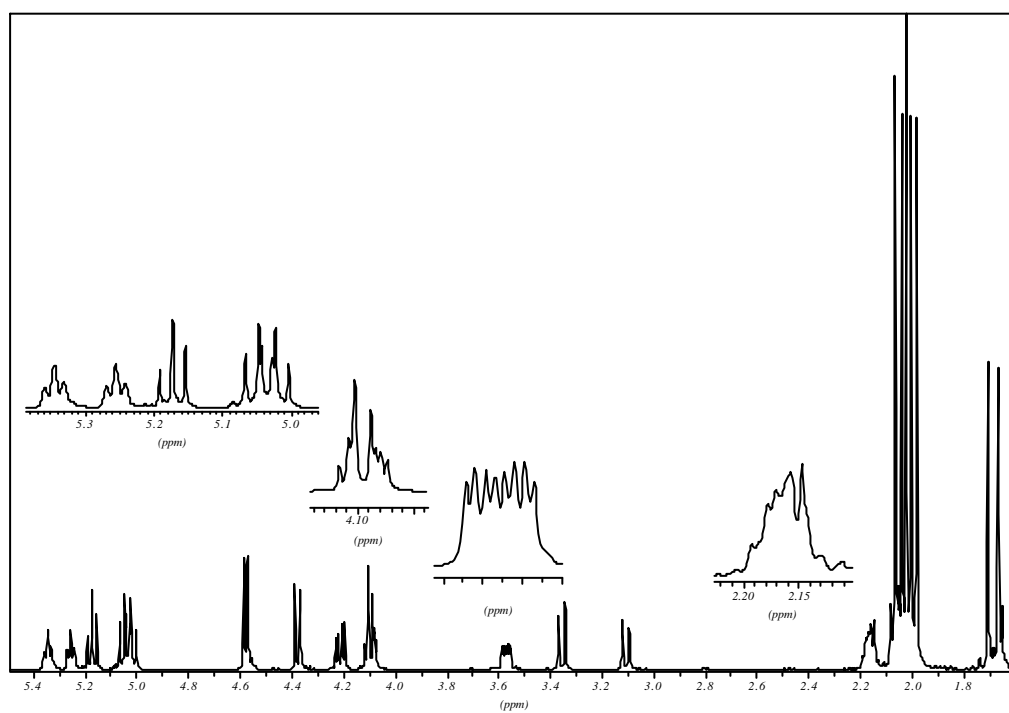


Abb. 68: 8-Acetoxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **72**

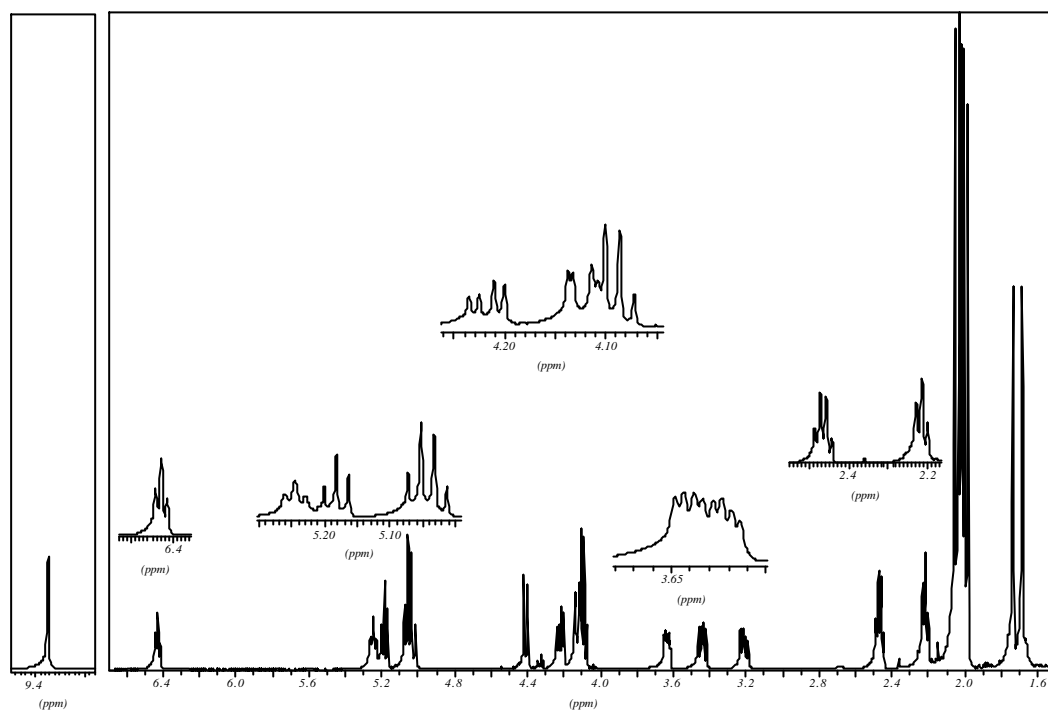


Abb. 69: 3,7-Dimethyl-8-oxo-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **73**

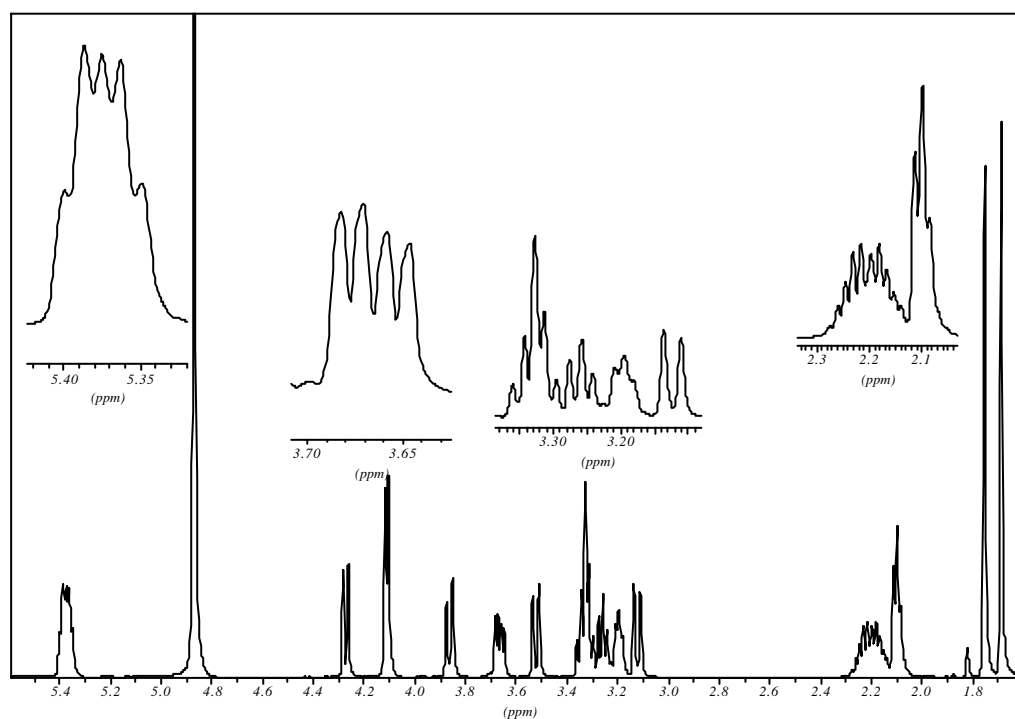


Abb. 70: 8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **40**

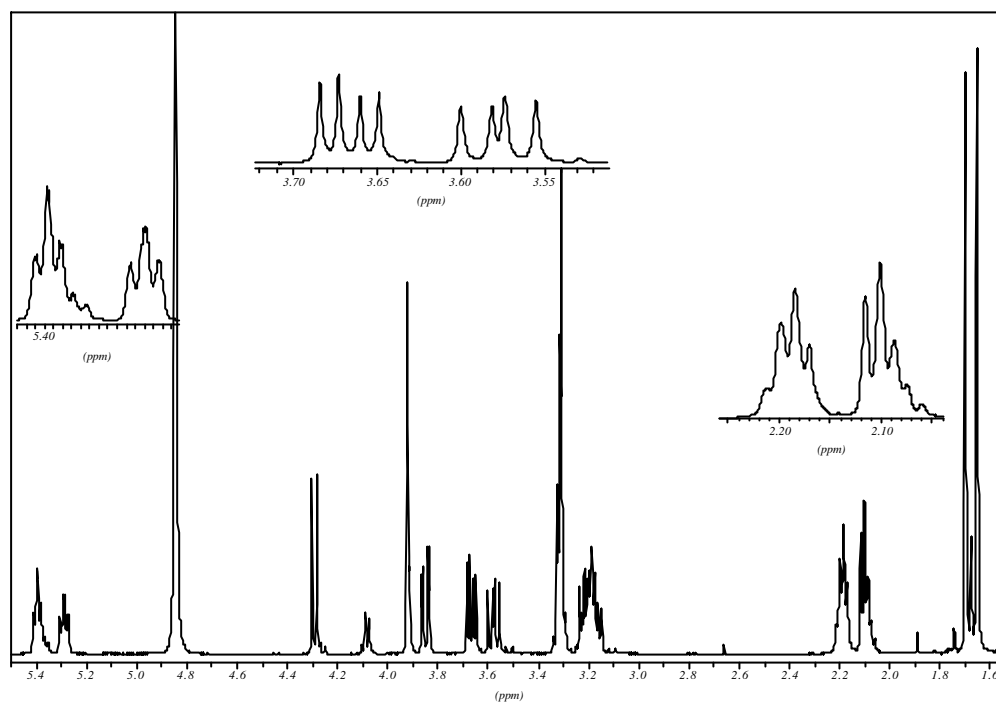


Abb. 71: 8-Hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **41**

7.4 ^{13}C -NMR-Spektren

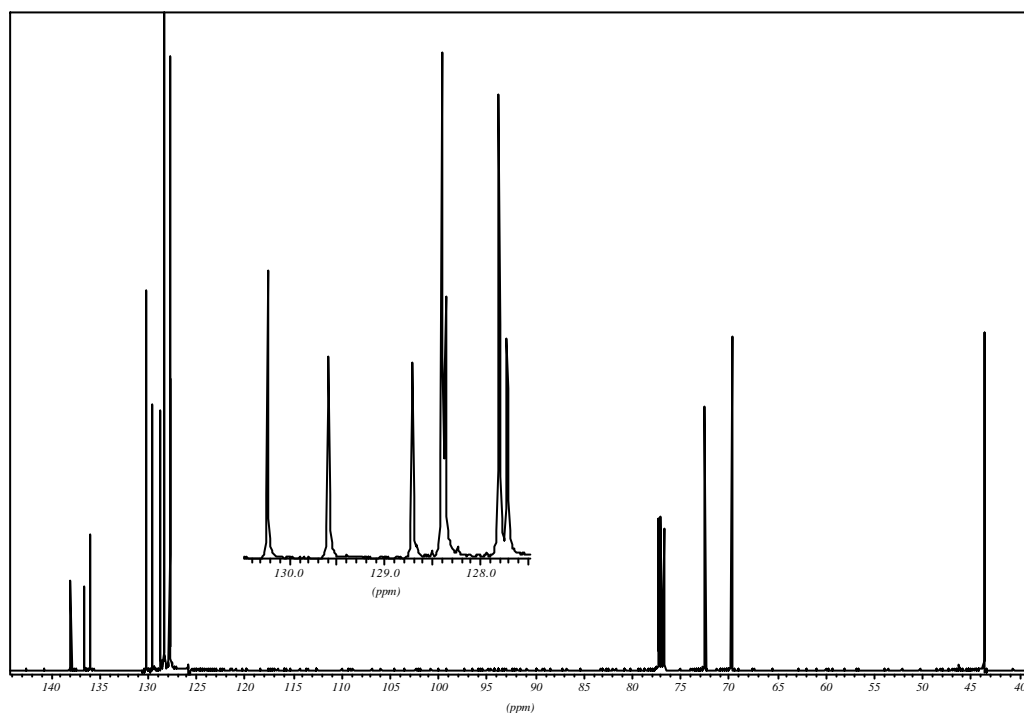


Abb. 72: 1-Chloromethyl-phenylmethoxymethyl-benzen 58

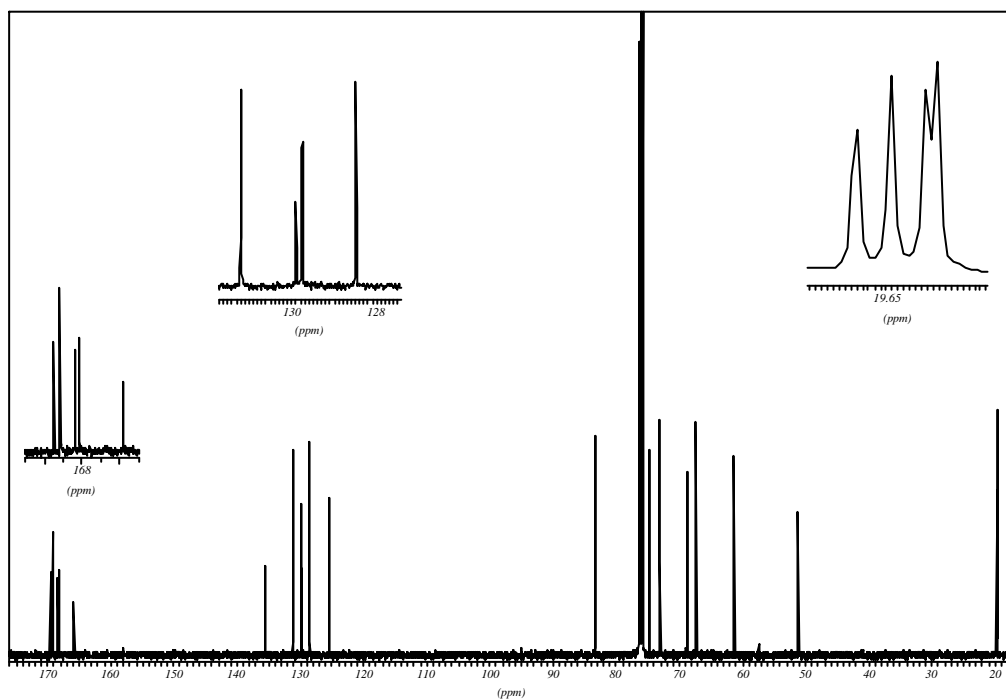


Abb. 73: 2-Methoxycarbonyl-phenylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucopyranosid 63

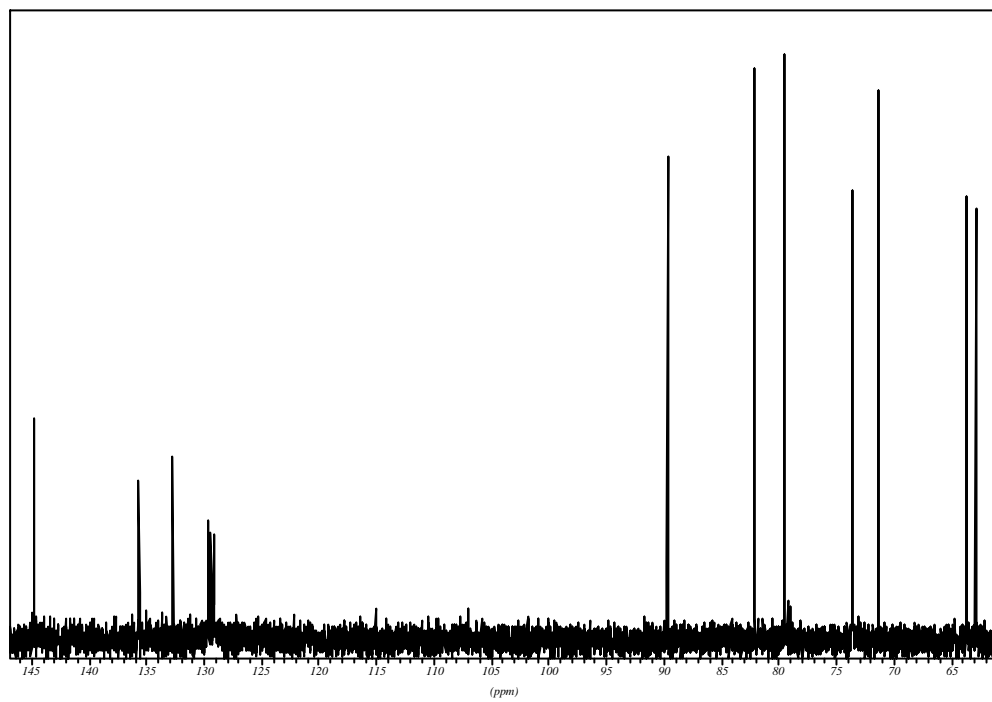


Abb. 74: 2-Hydroxymethyl-phenylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **38**

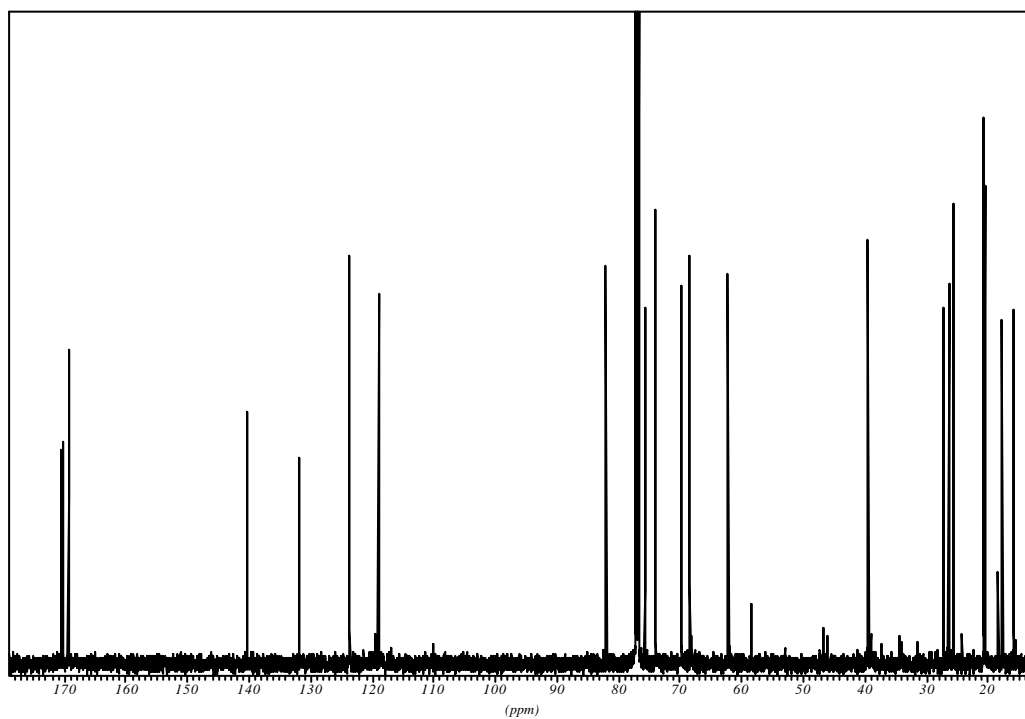


Abb. 75: 3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **67**

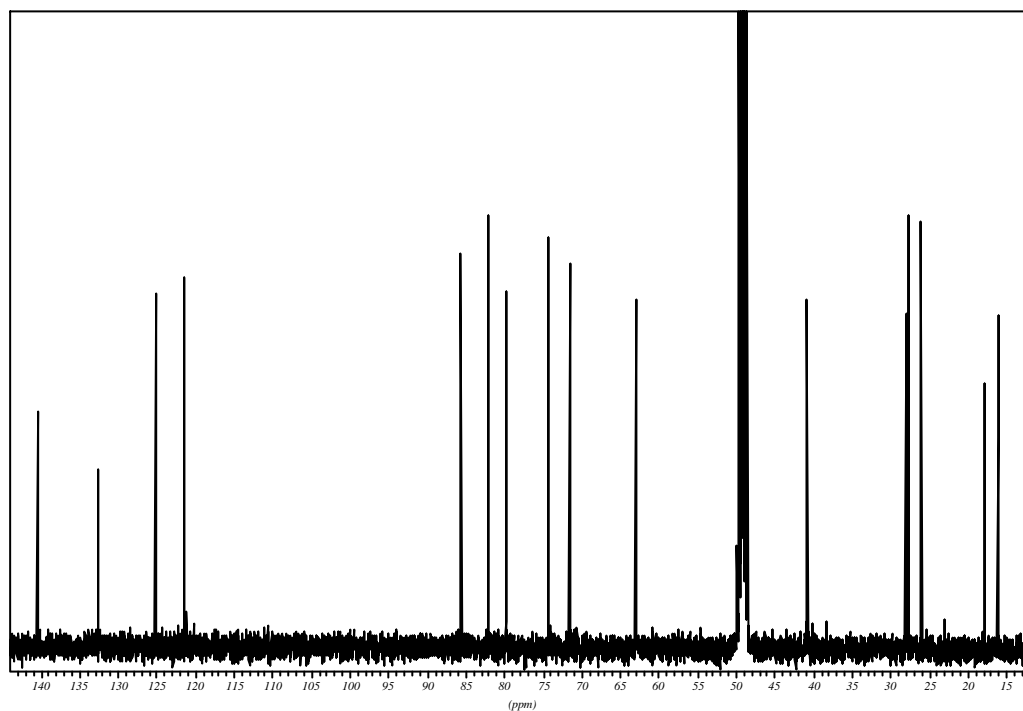


Abb. 76: 3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio-β-D-glucosid **39**

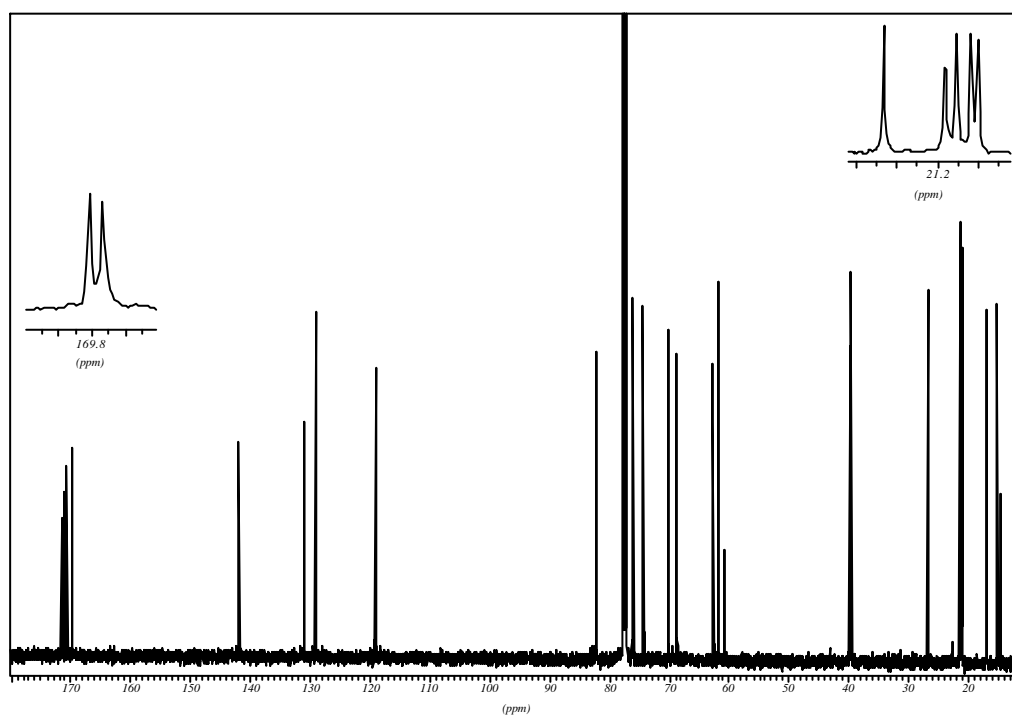


Abb. 77: 8-Acetoxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio-β-D-glucosid **72**

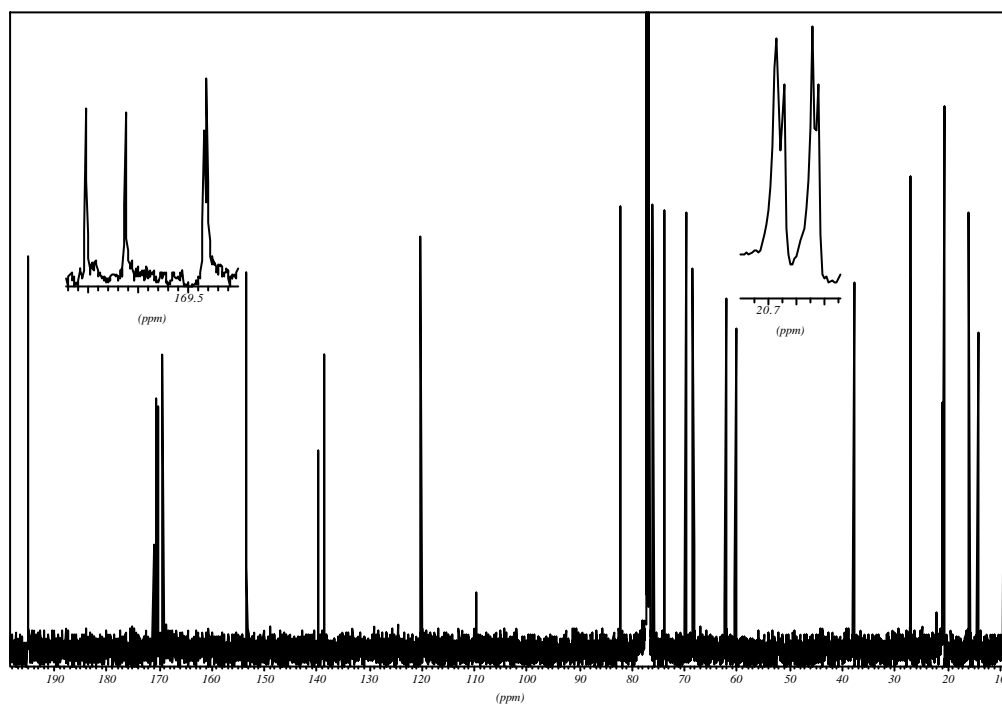


Abb. 78: 3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-2',3',4',6'-tetra-O-acetyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **73**

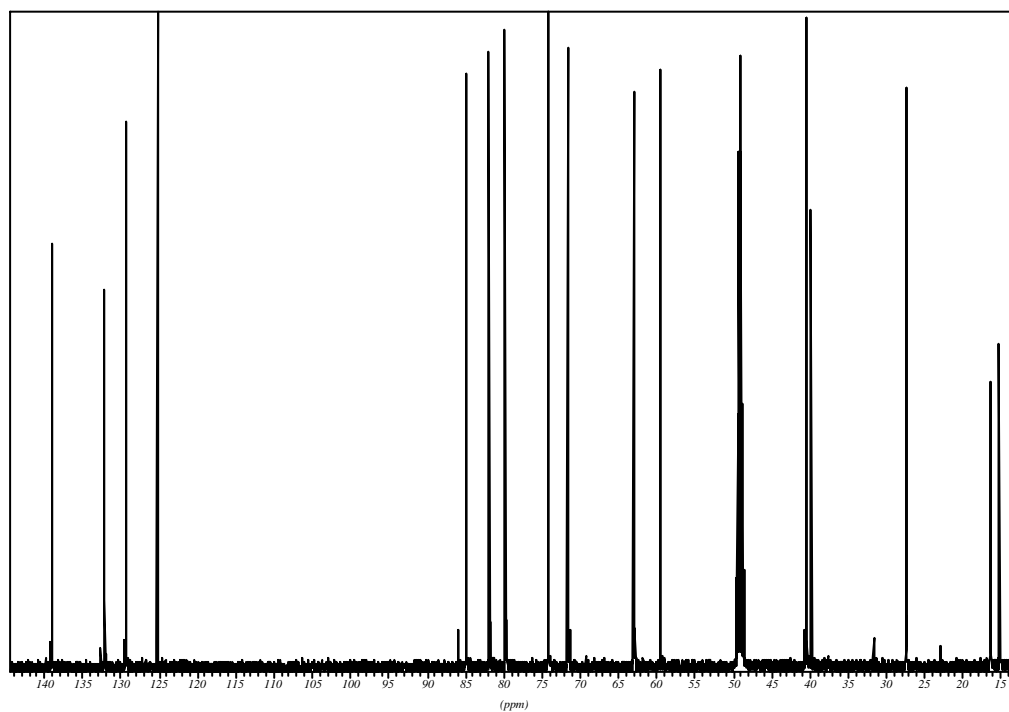


Abb. 79: 8-Hydroxy-2,6-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **40**

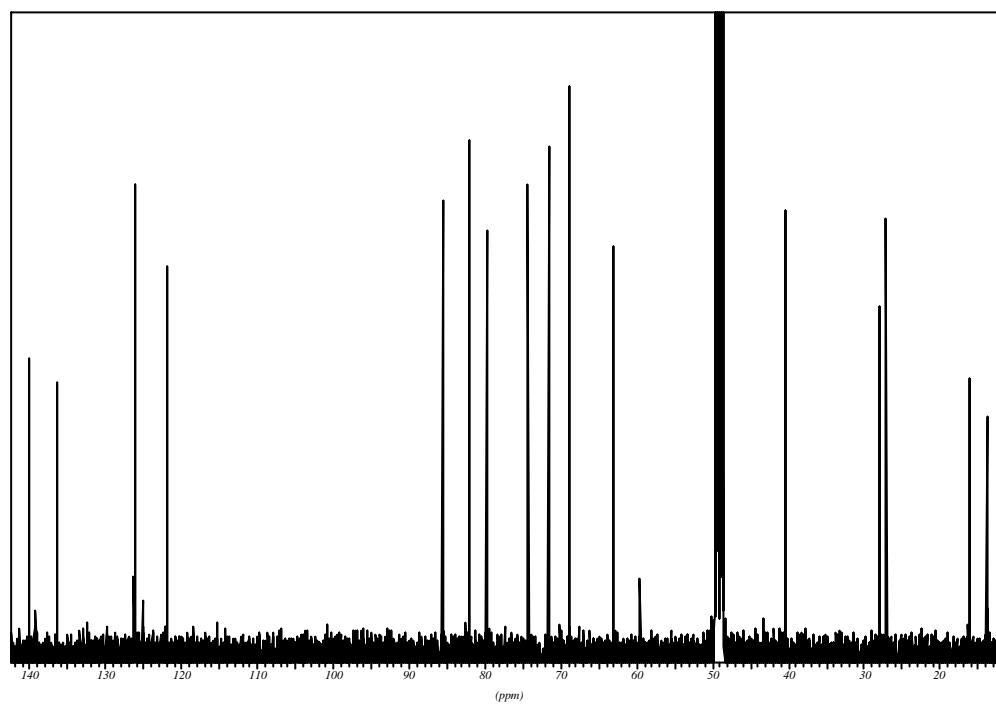


Abb. 80: 8-Hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,6-dienylsulfanyl-1'-thio- β -D-glucopyranosid **41**

7.5 Abkürzungen

ADDP	1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin
EE	Essigester
Et ₂ O	Diethylether
ges.	gesättigt
LM	Lösemittel
Lsg.	Lösung
MeOH	Methanol
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
NaOMe	Natriummethanolat
PE	Petrolether
THF	Tetrahydrofuran
gesch.	geschützt
PAs	Pyrrolizidin-Alkaloide
PA-Os	Pyrrolizidin-Alkaloid- <i>N</i> -Oxide
PCC	Pyridiniumchlorchromat

7.6 Veröffentlichungen

Artikel in Fachzeitschriften

Douglas B. Weibel, Neil J. Oldham, Birte K. Feld, Gereon Glombitza, Konrad Dettner, Wilhelm Boland. *Iridoid Biosynthesis in Staphylinid Rove Beetles (Coleoptera: Staphylinidae, Philonthinae)*. Insect Biochem. **2001**; 31: 583-591.

Birte K. Feld, Jaques Pasteels, Wilhelm Boland. *Phaedon cochleariae and Gastrophysa viridula (Coleoptera: Chrysomelidae) produce Defensive Iridoid Monoterpenes de novo and are able to sequester glycosidically bound Terpenoid Precursors*. Chemoecology; eingereicht.

Vortrag

10.1999 *Salicylaldehyd- und Iridoidbiosynthese in Blattkäferlarven: Evolutive Aspekte*. 18. Fränkisches Naturstoffchemikertreffen, Bayreuth

Poster

30.10.2000 Birte K. Feld, Wilhelm Boland. *Evidence for Glucoside Transporters in Gut and Defensive Glands of Leaf Beetle Larvae (Coleoptera, Chrysomelidae)*. reguläre Instituts-evaluierung

7.7 Lebenslauf

	Birte Kristina Feld
	*3. Mai 1973
	Schule
1979-1983	Gemeinschaftsgrundschule Hasten, Remscheid
1983-1992	Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium, Remscheid
	Studium
Okt. 1992 – Sep. 1994	Grundstudium der Chemie an der Bergischen Universität und Gesamthochschule Wuppertal
	<u>Abschluss:</u> Vordiplom
Okt. 1994 – Aug. 1997	Hauptstudium der Chemie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
	<u>Abschluss:</u> Diplom
	Diplomarbeit „Zur Bedeutung von glycosidisch gebundenen Phenolen als Vorstufen von Wehrsubstanzen bei Blattkäferlarven“ unter der Leitung von Prof. W. Boland
Jan. 1998 – März 2001	Anfertigung der Doktorarbeit zum Thema: „Evolution der Wehrchemie von Blattkäferlarven: Glucosid-Analoga zur Aufklärung von Transport-Mechanismen“ am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena unter der Leitung von Prof. W. Boland
	Preise
Juni 1992	Buchpreis des Fonds der Chemischen Industrie

7.8 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland für die interessante Themenstellung und viele anregende Diskussionen, Herrn Prof. Dr. Jacques Pasteels für die Versorgung mit Larven und seine Anregungen aus der Sicht eines Biologen und Herrn Prof. Dr. Ernst Anders für die Betreuung von Seiten der Universität Jena.

Außerdem danke ich meinen Arbeitskollegen Dr. Stefan Bartram, Christoph Beckmann, Dr. Rita Büchler, Dr. Jürgen Engelberth, Dr. Gereon Glombitza, Dr. Christian Hertweck, Dr. Michal Hoskovic, Dr. Andrew Jarvis, Verena Jung, Andreas Jux, Thomas Koch, Jürgen Kuhn, Dr. Maritta Kunert, Andrea Lehr, Dr. Patrice Marchand, Dr. Jörn Piel, Dr. Christoph Steinbeck, Dr. Elke Trummer und Grit Winnefeld für das angenehme Klima und ihre Unterstützung. Das gleiche gilt für meine Hiwis Ralph Wege und Christiane Kühn.

Besonderer Dank geht an:

Janine Rattke und Dr. Neil Oldham für die Aufnahme der MS-Spektren,
Dr. Renate Ellinger und Dr. Bernd Schneider für die Aufnahme der NMR-Spektren,

Helmar Görls für Messung der Kristallstrukturanalyse

Angelika Berg, Andrea Lehr und Jana Schubert für die Betreuung meiner Larven,
Dr. Georg Pohnert für die Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und das Korrekturlesen,

Otmar Schaaf und Sabine Thiessen, die unermüdlich auf Fragen antworteten, die immer gleich begannen: „Du bist doch Biologe...“,

Dieter Spittler für die Unterstützung an der LC-Q,
meinen Mitbewohnern Dr. Göde Schüler und Oliver Fietz,

Ulrike Krause, Linda Müller, Karina Merten und Annett Übel für die besonders umfassende Betreuung in unserer Bibliothek, die auch die Versorgung mit Tee und Schokolade beinhaltete und

Ryan Lauchli für die moralische Unterstützung.

Außerdem danke ich meiner Familie, weil sie immer für mich da war.